

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 562**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2011 PCT/AU2011/000155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO2011100786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011 E 11744183 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2536430**

54 Título: **Composiciones y métodos para el coteje de células productoras de interferos del tipo 1**

30 Prioridad:

17.02.2010 US 707297

17.08.2010 US 374489 P

17.08.2010 US 374497 P

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

21.06.2017

73 Titular/es:

CSL LIMITED (100.0%)

45 Poplar Road

Parkville, Victoria 3052, AU

72 Inventor/es:

VAIRO, GINO, LUIGI;

NASH, ANDREW;

MARASKOVSKY, EUGENE;

WILSON, NICK;

BUSFIELD, SAMANTHA y

PANOUSIS, CON

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 618 562 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).

Composiciones y métodos para el coteje de células productoras de interferos del tipo 1**Descripción**5 CAMPO

[0001] La presente descripción se refiere al tratamiento de enfermedades inflamatorias.

10 ANTECEDENTES

10 [0002] La familia de interferones (IFN) de citoquinas comprende subgrupos tanto de tipo I como de tipo II. El subgrupo de tipo I se compone de IFN α , IFN β , IFN γ , IFN δ , y IFN ϵ y el subgrupo de tipo II se representa por IFN γ . Los IFN de tipo I tienen múltiples efectos inmunomoduladores incluyendo la estimulación de respuestas de células T policlonales, el cambio de isotipos, la expresión de complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC) y la inducción de la diferenciación de células dendríticas (DC). Los IFN de tipo I estimulan tanto a los macrófagos como a las células aniquilantes naturales (NK) para obtener una respuesta antiviral, y también son activos contra tumores. Los IFN de tipo I también actúan como factores pirógenos alterando la actividad de las neuronas termosensibles en el hipotálamo, causando así fiebre. Una característica del sistema IFN de tipo I es la rápida inducción y amplificación de vías de señalización, garantizando que está montada una vigorosa respuesta inmune antiviral.

20 [0003] Sin embargo, aunque tales vías son muy eficaces para la erradicación de virus rápida, esta amplificación puede estar maladaptada en las respuestas inmunes dirigidas contra los tejidos de huésped, lo que lleva a la enfermedad autoinmune. Los ejemplos incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide y glomerulonefritis.

25 [0004] El LES es una enfermedad autoinmune crónica en la que los defectos inmunes conducen a la producción de autoanticuerpos y la posterior inflamación y/o daños en los tejidos en múltiples órganos, incluyendo la piel, los riñones, la sangre, el cerebro y las articulaciones. El curso de la enfermedad puede ser crónicamente activo, recidivante y remitente o largo plazo. LES se caracteriza por el aumento de los niveles de muchas citocinas, incluyendo IFN de tipo I, tales como IFN α .

35 [0005] La evidencia de la función de IFN α en el LES se ha demostrado en varios estudios *in vitro* que muestran que el suero de pacientes con LES indujo maduración DC de monocitos de los mamíferos normales. De este modo, el suero de pacientes con LES puede inducir que los monocitos normalmente inactivos se conviertan en células presentadoras de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune. Además, la supresión de la expresión IFNAR1 (la cadena γ del receptor de IFN de tipo I) en un modelo de ratón de anemia hemolítica reducida de LES (ratones NZB), y glomerulonefritis reducida.

40 [0006] Clínicamente, los pacientes con LES activo a menudo han elevado niveles IFN de suero de tipo I, y estos niveles se correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad. La evidencia clínica adicional para un papel putativo de IFN α en el LES proviene de la observación de que los pacientes sin LES tratados con IFN α ocasionalmente desarrollan autoanticuerpos y manifestaciones clínicas consistentes con LES.

45 [0007] Interferones de tipo I se producen por muchos tipos de células incluyendo linfocitos (células NK, células B y células T), macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, osteoblastos y ciertas células dendríticas. Las células dendríticas plasmocitoides (pDCs) han sido identificadas como las productoras más potentes de IFN de tipo I en respuesta a antígenos extraños. Los pDC son un subtipo de células dendríticas circulantes que se encuentran en la sangre, así como en los órganos linfoides periféricos que son una fuente de interferones de tipo I. pDC Humanos normalmente expresan los marcadores de superficie IL-3 del receptor de la cadena γ (IL-3R α , CD123), BDCA-2 (CD303) y BDCA-4 (CD304), pero no expresan CD11c o CD14, que los distingue de células dendríticas convencionales o monocitos, respectivamente. Tras la estimulación y la activación subsiguiente, pDC producen grandes cantidades de interferones de tipo I (principalmente IFN- γ e IFN- β).

55 [0008] Dado el papel aparente para IFN α en enfermedades inflamatorias IFN-dependientes de tipo I como el LES, anticuerpos o proteínas solubles IFNAR que neutralizan la acción de esta citocina se persiguen como posibles enfoques terapéuticos.

60 [0009] Un enfoque alternativo sugerido para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de tipo I IFN-dependientes como el LES es el uso de compuestos que se unen a moléculas de superficie celular expresadas por células que expresan interferón de tipo I.

65 [0010] Una clase de compuestos que se han estudiado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes son inmunotoxinas que comprenden una única cadena Fv (scFv) a partir de un anticuerpo conjugado a una toxina. Estos compuestos se han sugerido para ser útiles para matar células que expresan IL-3R α . Sin embargo, estas moléculas sufren de numerosas desventajas. Por ejemplo, se sabe que las inmunotoxinas causan daño al hígado y al riñón. El

tamaño pequeño de una toxina conjugada con un scFv también puede significar que la inmunotoxina se elimina rápidamente por los riñones, exacerbando aún más el daño a este órgano y lo que significa que la inmunotoxina no puede retenerse en el cuerpo durante un tiempo suficiente para conferir un beneficio. Además, el componente de toxina es generalmente no humano, lo que significa que pueden inducir una respuesta inmune en un paciente. Esta respuesta inmune puede neutralizar la molécula. Por consiguiente, tales inmunotoxinas pueden no ser susceptibles a múltiples tratamientos, que pueden ser necesarios para tratar una enfermedad autoinmune crónica

[0011] La solicitud de patente WO2008127735 describe inmunotoxinas que comprenden anticuerpos anti-IL 3 R alfa para su uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como el lupus.

RESUMEN

[0012] La invención proporciona una inmunoglobulina que une una cadena de receptor \langle de interleucina 3 (IL-3R \langle) e inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3, como el producido por el 7G3 designado por hibridoma como se ha depositado en la ATCC con el número de acceso HB-12009, a IL-3R α y que reduce las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y basófilos al que se une para su uso en el tratamiento de lupus en un mamífero, en el que la inmunoglobulina no está conjugado con un compuesto tóxico que mata una célula a la que la inmunoglobulina se une y en donde la inmunoglobulina es capaz de inducir un nivel mejorado de la función efectora, donde la función efectora es: (i) citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); (ii) fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) y/o (iii) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0013] La invención proporciona además el uso de una inmunoglobulina que se une a una cadena de receptor \langle de interleucina 3 (IL-3R \langle) e inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3, como el producido por el hibridoma designado 7G3 depositado en la ATCC con el número de adhesión HB- 12009, a IL-3R α y que reduce las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y basófilos al que se une, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lupus en un mamífero, en el que la inmunoglobulina no está conjugada con un compuesto tóxico que mata una célula T o que se une el de inmunoglobulina y en el que la inmunoglobulina es capaz de inducir un nivel mejorado de la función efectora, en el que la función efectora es: (i) la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); (ii) fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) y/o (iii) citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0014] A diferencia de algunos de los enfoques anteriores, los presentes inventores se han dado cuenta de que el bloqueo del receptor de IFN de tipo I y/o IFN \langle puede carecer de especificidad suficiente para evitar poner en peligro los efectos positivos antivirales del IFN de tipo I. Los presentes inventores se centraron más bien en reducir o prevenir la actividad de IL-3 en células de respuesta de IL-3 y/o el deterioro o la eliminación de células de respuesta IL-3, como pDC y basófilos. Los presentes inventores hicieron uso de inmunoglobulinas contra IL-3R α para reducir o prevenir la actividad de IL-3 en células de respuesta IL-3 (es decir, que neutralizan la señalización de IL-3), tales como pDC y basófilos. Sin embargo, en los inventores encontraron que era poco probable que las inmunoglobulinas que sólo neutralizaran la señalización de IL-3 redujeran suficientemente los niveles de IFN α para proporcionar un beneficio terapéutico. De acuerdo con ello, los inventores hicieron uso de inmunoglobulinas, además, capaces de inducir un sistema inmune de un mamífero para al menos parcialmente agotar o eliminar células sensibles IL-3 (por ejemplo, pDC y basófilos) para tratar de ese modo enfermedades inflamatorias IFN-dependientes de tipo I y condiciones asociadas con pDC y basófilos, por ejemplo, lupus. Mediante el uso de una inmunoglobulina capaz tanto de reducir como de prevenir la actividad de IL-3 en células de respuesta IL-3 y al menos parcialmente deterioran o eliminan células sensibles IL-3, los inventores fueron capaces de reducir los niveles de IFN α *in vitro*. Utilizando el sistema inmune de un mamífero para al menos parcialmente deteriorar o eliminar las células que responden a IL-3, es posible evitar el uso de toxinas y los efectos negativos asociados con ellas.

[0015] Dado que las pDC no son la única fuente de IFN de tipo I, pero son una fuente importante de IFN de tipo I en la enfermedad inflamatoria, los inventores consideran que los métodos proporcionados por la presente divulgación proporcionan un enfoque terapéutico más preciso y específico que es menos probable que niega los efectos positivos de los IFN de tipo I que los métodos dirigidos al receptor de IFN de tipo I y/o IFN \langle . Una enfermedad inflamatoria dependiente de IFN de tipo I particular es el lupus, por ejemplo, LES.

[0016] Los inventores también encontraron que las inmunoglobulinas que tienen una mayor capacidad para inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) eran capaces de reducir la producción de IFN α y/o el número de circulación de pDC y basófilos a una dosis baja. Los inventores también encontraron que estos efectos duraron varios días después de la administración y que la duración del efecto es dependiente de la dosis.

[0017] Los inventores también encontraron que la pDC y números de basófilos se recuperan después de la administración de la inmunoglobulina, lo que significa que la respuesta de un mamífero inmune (por ejemplo, a virus) también se recupera después del tratamiento.

5 [0018] La presente descripción proporciona un método para tratar lupus en un mamífero, comprendiendo el método la administración al mamífero de una inmunoglobulina que se une a una cadena IL-3R ζ y neutraliza la señalización de IL-3 y que agota o al menos parcialmente elimina pDC y basófilos al que se une para tratar así lupus en el mamífero, en el que la inmunoglobulina no está conjugada con un compuesto tóxico que mata una célula al que se une la inmunoglobulina. En un ejemplo, el lupus es LES.

10 [0019] La presente descripción adicional o alternativamente, proporciona un método de tratamiento de lupus en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración al mamífero de una inmunoglobulina que se une a una cadena IL-3R ζ e inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3 a IL-3R α y que agota o al menos parcialmente elimina pDC y basófilos a los que se une para tratar de este modo el lupus en el mamífero. En un ejemplo, la inmunoglobulina se une a un IL-3R ζ y neutraliza la señalización de IL-3. En un ejemplo, el lupus es LES.

15 [0020] La presente descripción adicional o alternativamente proporciona un método de tratamiento de lupus en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración al mamífero de una inmunoglobulina que se une a una cadena IL-3R ζ e inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3 a IL-3R α y que agota o al menos parcialmente elimina pDC y basófilos al que se une para tratar así lupus en el mamífero, en el que la inmunoglobulina no se conjuga a un compuesto tóxico que mata una célula al que se une inmunoglobulina. En un ejemplo, la inmunoglobulina se une a un IL-3R ζ y neutraliza la señalización de IL-3. En un ejemplo, el lupus es LES.

20 [0021] La presente descripción también proporciona un método de tratamiento del síndrome de Sjögren en un mamífero, comprendiendo el método la administración al mamífero de una inmunoglobulina que se une a una cadena IL-3R ζ , en la que la inmunoglobulina neutraliza la señalización de IL-3 y/o inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3 a IL-3R α , y en el que la inmunoglobulina agota o al menos parcialmente elimina pDC y basófilos al que se une para tratar así síndrome de Sjögren en el mamífero, y en el que la inmunoglobulina no está conjugada con un compuesto tóxico que mata una célula a la que se une la inmunoglobulina.

25 [0022] La presente descripción también proporciona un método de tratamiento de la esclerodermia en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración al mamífero de una inmunoglobulina que se une a una cadena IL-3R ζ , en la que la inmunoglobulina neutraliza la señalización de IL-3 y/o inhibe la unión del anticuerpo monoclonal 7G3 a IL-3R α , y en la que la inmunoglobulina agota o al menos parcialmente elimina pDC y basófilos al que se une para tratar así esclerodermia sistémica en el mamífero, en el que la inmunoglobulina no está conjugado con un compuesto tóxico que mata una célula a la que se une la inmunoglobulina. En un ejemplo, la esclerodermia es esclerodermia sistémica.

35 [0023] En un ejemplo adicional, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica para uso de acuerdo con los ejemplos mencionados anteriormente de la divulgación, la composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina que se une a una cadena IL-3R ζ y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente. Se describen aquí inmunoglobulinas ejemplares y se aplican a este ejemplo de la descripción. En un ejemplo, la inmunoglobulina no está conjugada con un compuesto tóxico que mata una célula a la que se une la inmunoglobulina. En un ejemplo, la inmunoglobulina agota o al menos parcialmente elimina pDC y basófilos a los que se une. En un ejemplo, la inmunoglobulina se une a un IL-3R ζ y neutraliza la señalización de IL-3. En un ejemplo, la inmunoglobulina inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3 a IL-3R α .

40 [0024] En un ejemplo adicional, la presente descripción proporciona un kit para uso de acuerdo con los ejemplos mencionados anteriormente de la divulgación, el kit comprende una inmunoglobulina que se une a una cadena IL-3R ζ ; un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; e instrucciones para el uso del kit. Inmunoglobulinas ejemplares que se unen a un polipéptido de IL-3R α se describen en este documento y se van a tomar para aplicarse *por analogía* al ejemplo presente de la divulgación.

45 [0025] En un ejemplo, el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la inmunoglobulina para neutralizar la señalización de IL-3 y agota o al menos elimina parcialmente pDC y basófilos en el mamífero.

50 [0026] En un ejemplo, la IL-3R ζ se expresa por un pDC que produce uno o más interferones de tipo I. De acuerdo con ello, en un ejemplo, la inmunoglobulina se une a la IL-3R α en un pDC que produce uno o más interferones de tipo I.

55 [0027] En un ejemplo, la cadena IL-3R α se expresa por basófilos que producen una o más citoquinas. De acuerdo con ello, en un ejemplo, la inmunoglobulina se une a los IL-3R α en basófilos que producen una o más citoquinas.

60 [0028] En un ejemplo, la inmunoglobulina se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 7G3.

[0029] En otro ejemplo, la inmunoglobulina se une a un epítipo que se superpone con el epítipo unido por el anticuerpo monoclonal 7G3.

65 [0030] En un ejemplo, la inmunoglobulina se une específicamente a la IL-3R ζ .

[0031] En un ejemplo, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina desnuda.

[0032] Las inmunoglobulinas ejemplares contempladas en la presente descripción son anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

[0033] En un ejemplo, la inmunoglobulina es un anticuerpo de longitud completa.

[0034] En un ejemplo, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina quimérica, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o fragmento de unión de antígeno del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico comprende las regiones de cadena pesada variable (V_{HS}) y regiones variables de cadena ligera (V_{LS}) de un anticuerpo producido por un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón) y regiones constantes de un ser humano. En un ejemplo, el anticuerpo quimérico comprende regiones variables del anticuerpo monoclonal 7G3.

[0035] En otro ejemplo, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo. En un ejemplo, el anticuerpo humanizado o su fragmento de unión a antígeno es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 7G3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas del anticuerpo monoclonal 7G3. En un ejemplo, el anticuerpo humanizado comprende las CDRs de la V_H del anticuerpo monoclonal 7G3. En un ejemplo adicional o alternativo, el anticuerpo humanizado comprende CDR2 y CDR3 de la V_L del anticuerpo monoclonal 7G3 y CDR1 de 7G3 monoclonal, incluyendo una o más sustituciones de aminoácidos. En un ejemplo, el anticuerpo humanizado que comprende una cadena ligera de la región variable (V_L) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

[0036] En un ejemplo adicional, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana, tal como un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno de los mismos.

[0037] Fragmentos de unión a antígeno ejemplares contemplados por la presente divulgación incluyen:

- (i) un anticuerpo de dominio (dAb);
- (ii) un Fv;
- (iii) un scFv o una forma estabilizada del mismo (por ejemplo, un scFv estabilizado con disulfuro);
- (iv) un scFv dimerico o una forma estabilizada del mismo);
- (v) un diámetro, triabúcleo, tetracuerpo o multímero de orden superior;
- (vi) un fragmento Fab;
- (vii) un fragmento Fab²;
- (viii) un fragmento F(ab²);
- (ix) cualquiera de (i)-(viii) fusionado a una región Fc de un anticuerpo;
- (x) cualquiera de (i)-(viii) fusionado a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una célula efectora inmune.

[0038] Como será evidente para el experto en la materia a partir de la descripción de este documento, inmunoglobulinas ejemplares son capaces de deterioro o al menos eliminación parcial de las células a las que se unen sin conjugarse con un compuesto tóxico.

[0039] En un ejemplo, la inmunoglobulina hace que la célula sufra apoptosis.

[0040] En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de inducir una función efectora, por ejemplo, una función efectora que da como resultado la muerte de una célula a la que se une la inmunoglobulina. Las funciones efectoras ejemplares incluyen ADCC, fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0041] En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de inducir ADCC.

[0042] En un ejemplo, la inmunoglobulina comprende una región Fc del 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 de IgG1/IgG2 híbrida.

[0043] En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de inducir un nivel similar (por ejemplo, no significativamente diferente o dentro de aproximadamente 10%) o igual de la función efectora como una región Fc IgG3 humana de tipo silvestre y/o IgG1 humana.

[0044] En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de inducir un nivel similar (por ejemplo, no significativamente diferente o dentro de aproximadamente 10%) o igual de la función efectora como ch7G3 o hz7G3 como se describe en el presente documento.

[0045] En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de inducir un nivel mejorado de la función efectora.

[0046] En un ejemplo, el nivel de la función efectora inducida por la inmunoglobulina se incrementa con respecto al de la inmunoglobulina cuando comprende una región Fc de IgG1 de tipo salvaje.

[0047] En un ejemplo, la función efectora se mejora con relación a, o mayor que la de, ch7G3 o hz7G3 como se describe aquí.

[0048] En un ejemplo, la inmunoglobulina está afucosilada o comprende una región Fc que está afucosilada.

[0049] En otro ejemplo, la inmunoglobulina tiene un nivel inferior de fucosilación en comparación con una inmunoglobulina producida por una célula humana o CHO que no ha sido alterada para reducir el nivel de fucosilación de proteínas. De acuerdo con este ejemplo, se entenderá que un nivel inferior de fucosilación significa que en una composición que comprende la inmunoglobulina el porcentaje de inmunoglobulinas fucosiladas (por ejemplo, grupos de glicosilo unidos a Asn297 de un anticuerpo que comprende fucosa) es menor que el producido por una célula humana o CHO que no ha sido alterada para reducir el nivel de fucosilación de proteínas.

[0050] En un ejemplo, la inmunoglobulina es hz7G3V3. Por ejemplo, la inmunoglobulina es un anticuerpo afucosilado humanizado que comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la inmunoglobulina es un anticuerpo humanizado afucosilado que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

[0051] En un ejemplo, la inmunoglobulina es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 expresada por una célula de mamífero (por ejemplo, una célula CHO) que no expresan niveles detectables de (o expresa niveles reducidos de) α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8). En un ejemplo, la inmunoglobulina es un anticuerpo afucosilado humanizado que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4 expresada por una célula de mamíferos (por ejemplo, una célula CHO) que no expresa niveles detectables de (o expresa niveles reducidos de) α -1,6-fucosiltransferasa (FUT8).

[0052] En un ejemplo, la inmunoglobulina comprende una región Fc que comprende una o más sustituciones de secuencias 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 para un receptor Fc γ (Fc γ R) en comparación con una región Fc que no comprende las sustituciones. Por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácidos mejoran el aumento de la afinidad de la región Fc para un Fc γ R seleccionado del grupo que consiste en Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIC y Fc γ RIIIa en comparación con una región Fc que comprende las sustituciones. En un ejemplo, las una o más sustituciones de secuencias de aminoácidos son:

- i) S239D, A330L e I332E de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat; o
- ii) S239D e I332E de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat.

[0053] Por ejemplo, la inmunoglobulina es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una cadena pesada de la región variable (V_H) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en la que el anticuerpo comprende una región Fc que comprende:

una o más sustituciones de la secuencia de aminoácidos son:

- i) S239D, A330L e I332E de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat; o
- ii) S239D e I332E de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat.

[0054] En un ejemplo, la inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en: hz7G3V1 y hz7G3V2. Por ejemplo, la inmunoglobulina es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6 (hz7G3V1) o que comprende una cadena ligera que comprende un conjunto de secuencias en SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 (hz7G3V2).

[0055] En un ejemplo, después de la administración de la inmunoglobulina al mamífero el número de pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente un 50% en comparación con el número de los pDC y/o basófilos en circulación antes de la administración de la inmunoglobulina.

[0056] Por ejemplo, al menos aproximadamente seis horas después de la administración de la inmunoglobulina al

mamífero, el número de pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente un 50% en comparación con el número de los pDC y/o basófilos en circulación antes de administrar la inmunoglobulina.

5 **[0057]** Por ejemplo, el número de pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente un 50% en comparación con el número de pDC y/o basófilos en circulación antes de la administración de la inmunoglobulina durante al menos 7 días después de la administración sin otras administraciones de la inmunoglobulina. Por ejemplo, el número de pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente 50% en comparación con el número de pDC y/o basófilos en circulación
10 antes de administrar la inmunoglobulina durante al menos 8 días o 10 días o 11 días o 15 días o 20 días o 21 días o 22 días o 28 días o 35 días o 42 días o 49 días o 50 días o 57 días o 60 días o 63 días o 70 días después de la administración sin más administraciones de la inmunoglobulina.

15 **[0058]** Por ejemplo, el número de pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente 50% o 55% o 60% o 65% o 70% o 75% o 80% o 85% o 90 % o 95% o 96% o 97% o 98% o 99% en comparación con el número de los pDC y/o basófilos en circulación antes de administrar la inmunoglobulina.

20 **[0059]** En un ejemplo, el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la inmunoglobulina, tal como una cantidad terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina.

25 **[0060]** En un ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,0001/kg y 50 mg/kg de inmunoglobulina al mamífero. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,0005 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 10 m/kg y aproximadamente 30 mg/kg. Por ejemplo, el método comprende la administración de entre aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg.

35 **[0061]** En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 0,1 mg/kg.

[0062] En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 1 mg/kg.

40 **[0063]** En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 10 mg/kg.

[0064] En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 30 mg/kg.

45 **[0065]** En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra al mamífero una pluralidad de veces. En un ejemplo, el período entre administraciones es al menos aproximadamente 7 días, tal como al menos aproximadamente 8 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 9 días o 10 días. En un ejemplo, el período entre administraciones es de al menos aproximadamente 11 días. En otro ejemplo, el período entre administraciones es de al menos aproximadamente 15 días, tal como al menos aproximadamente 16 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 18 días o 20 días. En un ejemplo, el período entre administraciones es de al menos aproximadamente 22 días. En otro ejemplo, el período entre administraciones es de al menos aproximadamente 25 días, tal como al menos aproximadamente 30 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 40 días o 45 días. En un ejemplo, el período entre administraciones es de al menos aproximadamente 57 o 60 días.

55 **[0066]** Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de entre 0,0001/kg y 5 mg/kg, por ejemplo entre 0,0005/kg y 5 mg/kg, por ejemplo, entre 0,001 mg/kg y 5 mg/kg, tal entre 0,005 mg/kg y 5 mg/kg y 5 mg/kg y el período entre administraciones es de al menos 7 días o 8 días o 9 días o 10 días o 11 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis comprendida entre 0,01 mg/kg y 5 mg/kg y el período entre administraciones es de al menos 7 días o 8 días o 9 días o 10 días o 11 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg y el período entre administraciones es de al menos 7 días o 8 días o 9 días o 10 días o 11 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis entre 0,1 mg/kg y 1 mg/kg y el período entre administraciones es de al menos 7 días o 8 días o días o 10 días o 11 días. En algunos ejemplos, el período entre administraciones es de al menos aproximadamente 7 días y menos de aproximadamente 22 días, tal como al menos aproximadamente 11 días o 15 días y menos de aproximadamente 20 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 13 días e inferior a aproximadamente 18 días.

65 **[0067]** En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 0,1 mg/kg y el período entre administraciones es de 6 días o 7 días o de 8 días o 9 días o 10 días o 11 días o 14 días o 15 días.

[0068] En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 1 mg/kg y el período entre administraciones es de 6 días o 7 días o de 8 días o 9 días o 10 días o 11 días o 14 días o 15 días o 20 días o 21 días o 22 días.

[0069] Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de entre 6 mg/kg y 50 mg/kg y el período entre administraciones es de al menos unos 15 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina 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 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 aproximadamente 20 días e inferior a aproximadamente 70 días, tal como al menos aproximadamente 21 o 22 días e inferior a aproximadamente 65 días, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 días y menos de aproximadamente 57 días.

[0070] En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 10 mg/kg y el período entre administraciones es de 14 días o 15 días o 21 días o 22 días o 30 días o 48 días o 50 días o 56 días o 57 días o 60 días.

[0071] En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de 30 mg/kg y el período entre administraciones es de 14 días o 15 días o 21 días o 22 días o 30 días o 48 días o 50 días o 56 días o 57 días o 60 días.

[0072] En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra a un mamífero que padece lupus, por ejemplo, LES durante un tiempo y en condiciones para reducir el nivel de complejos inmunes circulantes y/o autoanticuerpos y/o la inflamación u otros síntomas de lupus, por ejemplo, LES en el mamífero (por ejemplo, como se describe aquí). En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra una vez o una pluralidad de veces. Si la inmunoglobulina se administra una pluralidad de veces, en algunos ejemplos se administra un número suficiente de veces para reducir significativamente el nivel de complejos inmunes circulantes y/o autoanticuerpos y/o inflamación u otro síntoma de lupus, por ejemplo, LES en el mamífero (Por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos ejemplos, la inmunoglobulina se vuelve a administrar cuando el nivel de complejos inmunes circulantes y/o autoanticuerpos y/o inflamación u otro síntoma de lupus, por ejemplo, LES en el mamífero (por ejemplo, como se describe aquí) ya no es significativamente reducido.

[0073] En algunos ejemplos, si la inmunoglobulina se administra una pluralidad de veces, se administra un número suficiente de veces para reducir el nivel de complejos inmunes y/o autoanticuerpos y/o la inflamación u otros síntomas de lupus que circula, por ejemplo, LES en el mamífero (por ejemplo, como se describe aquí) a un nivel similar a (por ejemplo, dentro de 10% o 20%) de un sujeto sano. En algunos ejemplos, la inmunoglobulina se administra de nuevo cuando el nivel de complejos inmunes circulantes y/o autoanticuerpos y/o la inflamación u otros síntomas de lupus, por ejemplo, LES en el mamífero (por ejemplo, como se describe en el presente documento) ya no se reduce significativamente.

[0074] En un ejemplo, el método comprende adicionalmente la detección del nivel de complejos inmunes y/o autoanticuerpos y/o la inflamación u otros síntomas de lupus, por ejemplo en circulación, LES en el mamífero y si el nivel no es administración repetida reducida de la inmunoglobulina.

[0075] En un ejemplo, el nivel de complejos inmunes circulantes y/o autoanticuerpos y/o la inflamación u otros síntomas de lupus, por ejemplo, LES en el mamífero se reduce a un nivel detectado en un mamífero sano.

[0076] En un ejemplo, el método comprende adicionalmente la detección del número de pDC y/o basófilos en la circulación y/o en un tejido inflamado en el mamífero.

[0077] En un ejemplo, el método comprende, además, la repetición de la administración de la inmunoglobulina si el número de pDC y/o basófilos detectados en circulación está dentro de aproximadamente 50% del número de pDC y/o basófilos en circulación antes de la administración de la inmunoglobulina. Por ejemplo, el método comprende, además, la repetición de la administración de la inmunoglobulina si el número de pDC y/o basófilos detectado en la circulación está dentro de aproximadamente 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% del número de pDC y/o basófilos en circulación antes de la administración de la inmunoglobulina.

[0078] En un ejemplo, después de que la administración de la inmunoglobulina haya cesado, se incrementa el número de pDC y/o basófilos en circulación en el sujeto. Por ejemplo, el número de pDC y/o basófilos en circulación en el sujeto se incrementa a un nivel similar al nivel en un sujeto normal o sano y/o en una población de sujetos normales o sanos. Por ejemplo, el número de pDC y/o basófilos en circulación en el sujeto se incrementa después de aproximadamente 11 días o 20 días 22 días o 30 días o 57 días o 60 días o 65 días o 70 días siguientes al cese del tratamiento.

[0079] La presente descripción también proporciona un método para prevenir una recaída de lupus, por ejemplo, LES en un mamífero, comprendiendo el método la administración de una inmunoglobulina tal como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier ejemplo a un mamífero que experimenta una recaída acelerada de lupus, por ejemplo, LES o en riesgo de desarrollar una recaída de lupus, por ejemplo, LES a que impide la recaída de lupus, por ejemplo, LES.

[0080] En un ejemplo, el método comprende la administración de una cantidad eficaz de la inmunoglobulina, tal como una cantidad profilácticamente eficaz de la inmunoglobulina.

[0081] En un ejemplo, el método comprende, además, la identificación de un mamífero que se somete a una recaída de lupus, por ejemplo, LES. Por ejemplo, el método comprende la detección de autoanticuerpos (por ejemplo, contra C1q) y/o anticuerpos anti-ADNs y/o complejos inmunes en la circulación del mamífero. Los métodos para determinar un mamífero sometido a una recaída de lupus, por ejemplo, LES son conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

[0082] En un ejemplo, se administra la inmunoglobulina como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier ejemplo de la presente descripción.

[0083] En un ejemplo, un mamífero a tratarse requiere de tal tratamiento. Por ejemplo, el mamífero sufre de la enfermedad o condición o está en riesgo de desarrollar la enfermedad o condición o está experimentando una recaída de la enfermedad o condición o está en riesgo de recaída. En un ejemplo, el mamífero en necesidad de tratamiento tiene un mayor nivel de IFN α en circulación, por ejemplo, en comparación con el nivel detectado en una población de mamíferos sanos.

[0084] De manera adecuada, de acuerdo con los ejemplos antes mencionados de la presente descripción, el mamífero es un humano.

[0085] Otros objetos, ejemplos y ventajas se hacen evidentes de la siguiente descripción detallada. La descripción detallada y los ejemplos específicos se dan solamente a efectos ilustrativos, al hacerse evidentes diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la presente descripción para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada. Además, los ejemplos demuestran el principio de métodos descritos en la presente descripción y no ilustran específicamente la aplicación de la presente descripción a todos los ejemplos en los que será obviamente útil para los expertos en la técnica anterior.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0086]

Figura 1 es una representación gráfica que muestra el nivel medio de expresión de IL-3R α por célula (eje Y) en varios linajes de células (eje X).

Figura 2 incluye dos representaciones gráficas que muestran el porcentaje de basófilos (lado izquierdo) o pDC (lado derecho), antes y después de la administración de varias dosis de un anticuerpo humanizado afucosilado que se une a IL-3R α (hz7G3V3). Los números se representan como un porcentaje del total de células en una muestra de sangre periférica (eje Y). El momento de la recogida de sangre periférica con respecto al momento de la administración del anticuerpo se indica en el eje X. La dosis de anticuerpo también se indica.

La Figura 3 es una representación gráfica que muestra el nivel de lisis celular causada por la ADCC inducida por diversos anticuerpos en diferentes condiciones. La nomenclatura que designa los anticuerpos estudiados es consistente con la descripción en el presente documento. Los anticuerpos fueron estudiados en condiciones autólogas meta-efectoras (pDC1-NK1, NK2-pdc2) y condiciones diana alogénicas efectoras (pDC1-NK2, pDC2-NK1). Los resultados se presentan como porcentaje de lisis específica como se ha determinado como una función de lisis espontánea y la lisis máxima alcanzada con ExtranTM.

La Figura 4 incluye dos representaciones gráficas que muestran la cantidad de IFN α secretada en medio de cultivo celular por PBMC que contiene pDC activados con un oligonucleótido de CpG de tipo C. Se cultivaron las células con el anticuerpo indicado a la concentración indicada en el eje X. La cantidad de IFN α detectado usando un ELISA se indica en el eje Y. Los resultados de los ensayos realizados 6 horas (a la izquierda) y 24 horas (a la derecha) después de la activación con el oligonucleótido se muestran.

Figura 5 es una representación gráfica que muestra la cantidad de IFN α secretada en medio de cultivo celular por PBMC que contiene pDC activados con un oligonucleótido de CpG de tipo C. Las células se cultivaron con diversas concentraciones de un anticuerpo humanizado afucosilado que se une a IL-3R α (hz7G3V3) o un anticuerpo de control de isotipo (como se indica). La cantidad de IFN α detectada utilizando un ELISA se indica en el eje Y. Los resultados de los ensayos realizados 24 horas después de la activación se muestran con el oligonucleótido.

Figura 6 es una representación gráfica que muestra la cantidad de IFN α secretada en medio de cultivo celular por PBMC que contiene pDC activados con un oligonucleótido de CpG de tipo C. Las células se cultivaron con diversas concentraciones de un anticuerpo humanizado afucosilado que se une a IL-3R α (hz7G3V3) o un fragmento Fab del mismo anticuerpo (7G3 Fab) (como se indica). La cantidad de IFN α detectada utilizando un ELISA se indica en el eje Y. Los resultados de los ensayos realizados 24 horas tras la activación se muestran con el oligonucleótido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Clave para la lista de secuencias**[0087]**

- 5 SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos de una cadena IL-3R α .
 SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de una V_H de hz7G3.
 SEQ ID NO: 3 es una secuencia de aminoácidos de una V_L de hz7G3.
 SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de hz7G3.
 SEQ ID NO: 5 es una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de hz7G3.
 10 SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de hz7G3V1.
 SEQ ID NO: 7 es una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de hz7G3V2.

General

- 15 **[0088]** A lo largo de esta memoria descriptiva, salvo que se especifique lo contrario o que el contexto exija otra cosa, la referencia a un solo paso, la composición de la materia, grupo de pasos o grupo de composiciones de materia que deben tomarse para abarcar uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de esos pasos, las composiciones de la materia, los grupos de pasos o grupos de composiciones de materia.
- 20 **[0089]** Los expertos en la técnica apreciarán que la presente descripción es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Es de entenderse que la descripción incluye todas estas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todos los pasos, 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.
- 25 **[0090]** La presente descripción no ha de ser de ámbito limitado por los ejemplos específicos descritos en el presente documento, que se pretende con el propósito de ejemplificación solamente. Productos funcionalmente equivalentes, composiciones y métodos son claramente dentro del alcance de la presente descripción.
- 30 **[0091]** Cualquier ejemplo de la presente exposición que aquí se tendrá que aplicar, *mutatis mutandis*, a cualquier otro ejemplo de la revelación, a menos que se especifique lo contrario.
- [0092]** A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento se entenderá que haya el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química proteínica y la bioquímica).
- 35 **[0093]** A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo de células, y técnicas inmunológicas utilizadas en la presente descripción son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Estas técnicas se describen y explican en la literatura en fuentes tales 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), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad), Ed Harlow and David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).
- 40 **[0094]** La descripción y definición de regiones variables y sus partes, inmunoglobulinas, anticuerpos y fragmentos de los mismos en el presente documento pueden precisarse con más detalle por la discusión en Kabat Sequences of Protein of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991, Bork et al., J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994, Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901 -917, 1987, Chothia et al. Nature 342, 877-883, 1989 y/o Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273, 927-948, 1997.
- 45 **[0095]** El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se entiende que significa ya sea "X e Y" o "X o Y", debiendo adoptarse para proporcionar un apoyo explícito a los dos significados o para cualquiera de los significados.
- 50 **[0096]** 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 indicado, 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.
- 55 **[0097]** Tal como se utiliza aquí, el término "derivado de" se tomará para indicar que un entero especificado puede obtenerse de una fuente particular, aunque no necesariamente directamente de esa fuente.
- 60

Definiciones seleccionadas

- 5 **[0098]** Tal como se utiliza aquí, el término "inmunoglobulina" incluye cualquier producto de la proteína de unión a antígeno del complejo de genes de inmunoglobulina, incluyendo isotipos de inmunoglobulinas IgA, IgD, IgM, IgG e IgE y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Inmunoglobulinas ejemplares son anticuerpos. La inmunoglobulina puede ser policlonal o monoclonal, siendo anticuerpos monoclonales una forma de ejemplo de la divulgación. Incluido en el término "inmunoglobulina" son todas las inmunoglobulinas que son apropiadamente de-
10 inmunizadas para reducir por ello o eliminar una respuesta inmune por un mamífero a una inmunoglobulina que se ha administrado al mamífero. En el caso particular de tratamiento de seres humanos, las inmunoglobulinas adecuadas incluyen inmunoglobulinas quiméricas, humanizadas o humanqs. También se incluyen dentro del término "inmunoglobulina" son inmunoglobulinas modificadas, mutagenizadas, quiméricas y/o humanizadas que comprenden residuos de aminoácidos alterados o variantes, secuencias o glicosilación, tanto si se produce naturalmente como si se producen por la intervención humana (por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante). El experto apreciará
15 que las "inmunoglobulinas" de la presente divulgación pueden estar sustituidas con otros restos y/o secuencias de unión en base a inmunoglobulina alternativa o andamios de proteínas no de inmunoglobulina que se han adaptado para unirse a la cadena IL-3R α . Proteínas ejemplares incluyen una porción de unión al receptor Fc. Por ejemplo, las proteínas que abarcan el término "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos de dominio, anticuerpos de camélidos y anticuerpos de peces cartilaginosos (es decir, receptores de nuevos antígenos de inmunoglobulina (IgNARs)).
20 Generalmente, los anticuerpos de camélidos y IgNARs comprenden un V_H, sin embargo carecen de una V_L y se hace referencia a las inmunoglobulinas de cadena pesada como a menudo. Otras "inmunoglobulinas" incluyen receptores de células T y otras de dominio que contienen proteínas similares a inmunoglobulina que son capaces de unirse a un antígeno, por ejemplo, en virtud de un sitio de unión de antígeno que comprende una región variable.
- 25 **[0099]** 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 de polipéptidos, por ejemplo, un polipéptido que comprende una V_L y que comprende un polipéptido de una V_H. Un anticuerpo también comprende generalmente dominios constantes, algunos de los que se pueden disponer en una región constante o fragmento constante o fragmento cristalizante (Fc). Una V_H y una V_L interactúan para formar un Fv que comprende una región
30 de unión a antígeno que es capaz de unión específica a uno o unos pocos antígenos estrechamente relacionados. En general, una cadena ligera de mamíferos es o bien una cadena ligera λ o una cadena ligera μ y una cadena pesada de mamíferos γ , τ , ϵ , o δ . Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados, anticuerpos humanos y anticuerpos quiméricos.
35
- [0100]** Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "conjunto de anticuerpos" se utilizan indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, en oposición a un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesada y ligera 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
40 variantes de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.
- [0101]** Un "fragmento de unión de antígeno" de un anticuerpo comprende la unión a antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
45
- [0102]** 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 nativa de región Fc o secuencia de aminoácidos variante de la región Fc) de un anticuerpo que resultan en la eliminación de una célula. Ejemplos de funciones efectoras inducidas por anticuerpos incluyen: citotoxicidad dependiente del complemento; citotoxicidad
50 mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis de células dependientes de anticuerpos (ADCP); y la activación de células B. En el contexto de la presente descripción, el término "función efectora inducida por una inmunoglobulina" o término similar se utiliza intercambiamente con "función efectora de una inmunoglobulina" o término similar y cada uno proporciona soporte literal para el otro.
55
- [0103]** "Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada se unió a receptores de Fc ("FcR") presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células aniquilantes naturales ("NK"), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana-que llevan el antígeno y posteriormente maten la célula diana con citotoxinas. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, un ensayo *in vitro* de ADCC puede realizarse. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica ("PBMC") y las células NK.
60
- [0104]** Como se usa en este documento, "región variable" se refiere a las porciones de las cadenas pesadas de un anticuerpo como se define en este documento que es capaz de unirse específicamente a un antígeno y, por ejemplo,
65

incluye secuencias de aminoácidos de las CDR; es decir, CDR1, CDR2, y CDR3, y regiones de marco (FR). Por ejemplo, la región variable se compone de tres o cuatro FR (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y opcionalmente FR4) junto con tres CDR. V_H se refiere a la región variable de la cadena pesada. V_L se refiere a la región variable de la cadena ligera. Las posiciones de los aminoácidos asignados a CDR y FR se pueden definir de acuerdo con Kabat (1987 y 1991, *supra*) u otros sistemas de numeración en el rendimiento de los métodos de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, el sistema de numeración de bucle hipervariable de Clothia y Lesk (1987 y/o 1989, *supra* y/o Al-Lazikani *et al.*, 1997, *supra*). Por ejemplo, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, una V_H FRs y CDRs posicionados de la siguiente manera residuos 1 a 30 (FR1), 31-25 (CDR1), 36-49 (FR2), 50-65 (CDR2), 66-94 (FR3), 95-102 (CDR3) y 103-113 (FR4), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Por ejemplo, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, una V_L FR y CDR se posicionan de la siguiente manera residuos 1-23 (FR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FR3), 89-97 (CDR3) y 98-107 (FR4).

[0105] Tal como se utiliza aquí, el término "regiones determinantes de complementariedad" (*Syn.* CDRs, es decir, CDR1, CDR2, y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo que forman bucles entre las FR de la secuencia de los cuales varían entre los anticuerpos. Algunas o todas las CDR confieren la capacidad de unirse al antígeno del anticuerpo. Cada dominio variable típicamente tiene tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Cada región determinante de complementariedad puede comprender residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" tal como se define por Kabat *et al.*, (1991) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" Chothia y Lesk (1987), o cualquier otra técnica de numeración conocida o combinación de los mismos, incluyendo el sistema de numeración IMGT (Le Franc *et al.*, 2003).

[0106] "Regiones marco" (en adelante FR) son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de CDR.

[0107] El término "región constante" o "fragmento cristizable" o "Fc" o "región Fc" o "porción Fc" (que se puede utilizar intercambiamente en este documento) como se usa aquí, se refiere a una porción de un anticuerpo que comprende al menos un dominio constante y que es generalmente (aunque no necesariamente) glicosilada y que es capaz de unirse a uno o más receptores Fc y/o componentes de la cascada del complemento. La región constante de cadena pesada puede seleccionarse 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, por la elección de la región constante de cadena pesada deseada, las proteínas con función efectora deseada pueden producirse. Regiones constantes de cadena pesada ejemplares son γ 1 (IgG1), γ 2 (IgG2) y γ 3 (IgG3), o híbridos de los mismos.

[0108] Un "dominio constante" es un dominio en un anticuerpo de la secuencia que es altamente 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 cadenas pesadas ϵ , ζ y δ comprende dos dominios constantes.

[0109] Tal como se utiliza aquí, el término "se une específicamente" se tomará en el sentido de una inmunoglobulina reacciona o se asocia con mayor frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con IL-3R α o célula que expresa la misma que lo hace con los antígenos alternativos o células. También se entiende por la lectura de esta definición que, por ejemplo, una inmunoglobulina que se une específicamente a IL-3R α puede o no unirse específicamente a un segundo antígeno. Como tal, la "unión específica" no requiere necesariamente la unión exclusiva o unión de otro antígeno no detectable. El término: "se une específicamente" se usa indistintamente con "se une selectivamente" en el presente documento. Generalmente, la referencia en este documento a la unión significa unión específica, y cada término se entenderá para proporcionar apoyo explícito para el otro término.

[0110] El término "inhibe de forma competitiva" se entiende que significa que una inmunoglobulina reduce o impide la unión del anticuerpo monoclonal designado 7G3 t o IL-3R α . Será evidente de lo anterior que la inmunoglobulina no tiene que inhibir completamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3, sino que sólo tiene que reducir la unión en una cantidad estadísticamente significativa, por ejemplo, en al menos aproximadamente 10% o 20% o 30% o 40% o 50% o 60% o 70% o 80% o 90% o 95%. Los métodos para determinar la inhibición competitiva de la unión son conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 7G3 se expone a IL-3R α ya sea en presencia o ausencia de la inmunoglobulina. Si menos anticuerpo monoclonal se une en presencia de la inmunoglobulina que en ausencia de la inmunoglobulina, se considera que la inmunoglobulina inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3.

[0111] Por "solapamiento" en el contexto de dos epítopos se entenderá que dos epítopos comparten un número suficiente de residuos de aminoácidos para permitir una inmunoglobulina que se une a un epítipo para inhibir competitivamente la unión de una inmunoglobulina que se une al otro epítipo. Por ejemplo, los dos epítopos comparten al menos 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o más aminoácidos.

[0112] Tal como se utiliza aquí, el término "neutralizar" se entenderá en el sentido de que una inmunoglobulina es capaz de reducir o prevenir la señalización mediada por IL-3 en una célula y/o reducción o prevención de la unión IL-3 a la cadena IL-3R α y/o un heterodímero de la cadena IL-3R α y la cadena IL-3R β (también conocido como receptor de factor estimulante de colonias 2).

5 **[0113]** La referencia aquí a "anticuerpo monoclonal 7G3" o a "7G3" es una referencia al anticuerpo monoclonal producido por el 7G3 designado por hibridoma como se ha depositado en ATCC bajo el número de acceso HB-12009 y se describe en US6177078. El anticuerpo monoclonal 7G3 también está disponible comercialmente, por ejemplo, de BD Biosciences (NJ, EE.UU.).

10 **[0114]** El término "sistema de numeración de la UE de Kabat" se entenderá para significar que la numeración de una cadena pesada de inmunoglobulina está de acuerdo con el índice de la UE tal como se enseña en Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda. El índice de la UE se basa en la numeración de residuos del anticuerpo UE humano IgG1.

15 **[0115]** Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o célula que está siendo tratado en el curso de la patología clínica. Efectos deseables del tratamiento incluyen la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliar el estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. Un individuo es correctamente "tratado", por ejemplo, si uno o más síntomas asociados con una enfermedad (por ejemplo, lupus) se mitigan o se eliminan.

20 **[0116]** Tal como se utiliza aquí, el término "prevención" incluye proporcionar la 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 recaída de la enfermedad pero aún no se ha diagnosticado con la enfermedad o la recaída.

25 **[0117]** Tal como se usa en el presente documento, un mamífero "en riesgo" de desarrollar una enfermedad o condición o la recaída de la mismas (por ejemplo, LES) o de recaída puede o no tener la enfermedad detectable o síntomas de la enfermedad, y puede o no haber mostrado enfermedad detectable o síntomas de la enfermedad antes del tratamiento de acuerdo con la presente descripción. "En riesgo" denota que un mamífero tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros medibles que se correlacionan con el desarrollo de la enfermedad o condición, como se conoce en la técnica y/o se describe en este documento.

30 **[0118]** Una "cantidad eficaz" se refiere a al menos una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos 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, por el término "cantidad eficaz" se entiende una cantidad necesaria para efectuar el tratamiento de una enfermedad o condición como se describe anteriormente en esta memoria. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la enfermedad o afección a tratar y también de acuerdo con el peso, edad, raza, sexo, salud y/o la condición física y otros factores relevantes para el mamífero que se está tratando. Típicamente, la cantidad eficaz caerá dentro de un intervalo relativamente amplio (por ejemplo, un rango de "dosis") que puede ser determinado a través de ensayo 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.

35 **[0119]** 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 memoria puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad de la inmunoglobulina para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la inmunoglobulina son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

40 **[0120]** Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en los mamíferos antes de o en una fase anterior de la enfermedad, una cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que una cantidad terapéuticamente eficaz.

45 **[0121]** Como se usa en el presente documento, una "célula dendrítica plasmacitoide" o "pDC" es un tipo de circulación de células dendríticas que se encuentran en los órganos linfoides periféricos de sangre que producen interferones de tipo I, tales como, IFN α y IFN β . pDC humanos expresan los marcadores de superficie de IL-3R α , BDCA-2 (CD303), BDCA-4 (CD304) y los receptores de tipo toll 7 y 9. En general, pDC humanas no expresan CD11c o CD14. Un fenotipo de superficie pDC humano típico es CD20 $^{-}$, CD3 $^{-}$ CD14 $^{-}$, CD19 $^{-}$ CD56 $^{-}$, HLA $^{-}$ DR $^{+}$, CD11 $^{-}$ c y CD123 $^{+}$.

[0122] Como se usa en este documento, un "basófilo" es un tipo raro de granulocitos que produce diversas citoquinas (por ejemplo, IL-4, IL-6, IL-13), histamina y leucotrienos. Basófilos humanos expresan marcadores de superficie celular, tales como, IL-3R α , Fc ϵ R1, CD49b, CD69 o CD203.

[0123] El término "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a otro compuesto, por ejemplo, un compuesto tóxico o radiomarcador.

[0124] A los efectos de nomenclatura y no de limitación, la secuencia de aminoácidos de una cadena IL-3R α se enseña en Gene ID Accession Number 3563 y/o en la SEQ ID N°: 1.

[0125] El "mamífero" tratado de acuerdo con la presente exposición puede ser un primate, animales de granja (por ejemplo, ovejas, caballos, vacas, cerdos, burros), animales de compañía (por ejemplo, animales domésticos como perros y gatos), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas), el rendimiento de los animales (por ejemplo, caballos de carrera, camellos, galgos) o animal salvaje en cautividad. En un ejemplo, el mamífero es un humano.

Inmunoglobulinas

[0126] Inmunoglobulinas ejemplares adecuadas para su uso en un método de la presente descripción se describen en este documento y los siguientes párrafos describen inmunoglobulinas ejemplares adicionales.

[0127] En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de reducir la secreción de IFN α de PBMC que se han puesto en contacto con un inductor de secreción IFN α . Por ejemplo, los PBMC se exponen a un receptor de tipo toll (TLR)-7/9 agonista, tal como un oligonucleótido CpG, por ejemplo, un oligonucleótido de CpG de tipo C. Por ejemplo, las células en contacto con un oligonucleótido de CpG de tipo C en una concentración de 1 μ M o 2 μ M o 3 μ M o 4 μ M o 5 μ M. En un ejemplo, el nivel de IFN α se reduce en comparación al nivel en ausencia de la inmunoglobulina o en presencia de una inmunoglobulina de control de isotipo (por ejemplo, que no se une IL-3R α). En un ejemplo, el nivel de IFN α se reduce en aproximadamente 50% o al menos 60% o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90%. Por ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de lograr la reducción de IFN α a una concentración de entre 0,01 μ g/ml a aproximadamente 15 μ g/ml, tal como entre 0,04 μ g/ml a aproximadamente 4 μ g/ml, por ejemplo, entre 0,1 μ g/ml a aproximadamente 1 μ g/ml.

[0128] En otro ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de reducir el número de pDC y/o basófilos detectables en una población de PBMC. En un ejemplo, el número de pDC y/o basófilos es reducido en comparación con el nivel en ausencia de la inmunoglobulina o en presencia de una inmunoglobulina de control de isotipo (por ejemplo, que no se une IL-3R α). En un ejemplo, el número de pDC y/o basófilos se reduce en aproximadamente 50% o al menos 60 % o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90%. En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de reducir el número de pDC y/o basófilos dentro de 4 horas después de contactar la PBMC con la inmunoglobulina, o dentro de 24 horas después de contactar la PBMC con la inmunoglobulina o dentro de 48 horas después de contactar la PBMC con el inmunoglobulina.

[0129] En un ejemplo adicional, la inmunoglobulina es capaz de reducir el número de basófilos y/o pDC en la circulación de un mamífero (por ejemplo, un primate no humano, tal como un mono cynomolgus) durante al menos 7 días después de una sola administración a una dosis de no más de 2 mg/kg, por ejemplo, una dosis de no más de 1 mg/kg o una dosis de no más de 0,1 mg/kg. Por ejemplo, el número de basófilos y/o pDC se reduce a menos del 70% (o 80% o 90% o 95%) del número de las células antes de la administración de la inmunoglobulina. En un ejemplo, el número de células se calcula como un porcentaje del total de células en la sangre periférica. Por ejemplo, las células se reducen por lo menos 8 días o 10 días o 11 días. Por ejemplo, el número de pDC se reduce durante al menos 8 días o 9 días o 10 días o 11 días o 12 días o 13 días o 14 días o 15 días. En un ejemplo el número de pDC se reduce durante al menos 11 días. Por ejemplo, el número de basófilos se reduce durante al menos 5 días o 6 días o 7 días o de 8 días o 9 días o 10 días. En un ejemplo, el número de basófilos se reduce durante al menos 8 días.

[0130] En un ejemplo adicional, la inmunoglobulina es capaz de reducir el número de basófilos y/o pDC en la circulación de un mamífero (por ejemplo, un primate no humano, tal como un mono cynomolgus) durante al menos 15 días después de una administración única a una dosis de no más de 40 mg/kg, por ejemplo, una dosis de no más de 30 mg/kg o una dosis de no más de 10 mg/kg. Por ejemplo, el número de basófilos y/o pDC se reduce a menos del 70% (o 80% o 90% o 95%) del número de las células antes de la administración de la inmunoglobulina. En un ejemplo, el número de células se calcula como un porcentaje del total de células en la sangre periférica. Por ejemplo, las células se reducen durante al menos 21 días o 22 días o 30 días o 35 días o 40 días o 49 días o 50 días o 57 días o 63 días o 65 días o 70 días. Por ejemplo, el número de pDC se reduce durante al menos 12 días o 13 días o 14 días o 15 días o 16 días o 17 días o 18 días o 19 días o 20 días. En un ejemplo el número de pDC se reduce durante al menos 15 días. Por ejemplo, el número de basófilos se reduce durante al menos 12 días o 13 días o 14 días o 15 días o 16 días o 17 días o 18 días o 19 días o 20 días o 21 días o 22 días o 23 días o 24 días o 25

días o 26 días o 27 días o 28 días. En un ejemplo, el número de basófilos se reduce durante al menos 15 días (por ejemplo, después de una dosis de 10 mg/kg) o 22 días (por ejemplo, después de una dosis de 30 mg/kg).

[0131] En un ejemplo, la inmunoglobulina no reduce o agota el número de neutrófilos y/o células T y/o células B y/o monocitos y/o células rojas de la sangre cuando se administra a un mamífero (por ejemplo, un primate no humano, tal como un mono cynomolgus). Por ejemplo, la inmunoglobulina no reduce o agota el número de neutrófilos y/o células T y/o células B y/o monocitos y/o células rojas de la sangre en más de aproximadamente 10% o 20% o 30% o 40% o 50% o en una cantidad estadísticamente significativa en comparación con el nivel antes de la administración de la inmunoglobulina. Por ejemplo, la inmunoglobulina no induce la muerte de los neutrófilos y/o células T y/o células B y/o monocitos y/o células rojas de la sangre

Anticuerpos

[0132] En un ejemplo, una inmunoglobulina tal como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier ejemplo es un anticuerpo.

[0133] Los métodos para la generación de anticuerpos son conocidos en la técnica y/o descritos en Harlow y Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988). En general, en tales métodos de una proteína IL-3R α o fragmento inmunogénico o epítipo del mismo o una célula que expresa y presenta el mismo (es decir, un inmunógeno), opcionalmente formulados con cualquier vehículo adecuado o deseado, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable, se administra a un animal no humano, por ejemplo, un ratón, pollo, rata, conejo, cobaya, perro, caballo, vaca, cabra o cerdo. El inmunógeno puede administrarse por vía intranasal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, o por otra ruta conocida.

[0134] La producción de anticuerpos policlonales pueden ser monitoreados mediante el muestreo de sangre del animal inmunizado en varios puntos después de la inmunización. Una o más inmunizaciones adicionales se pueden dar, si es necesario para lograr un título de anticuerpos deseado. El proceso de impulsar y titulación se repite hasta que se alcanza un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, el animal inmunizado se sangra y se aísla el suero y se almacena, y/o el animal se utiliza para generar anticuerpos monoclonales (Mabs).

[0135] Los anticuerpos monoclonales son una forma ejemplar de anticuerpo contemplado por la presente divulgación. El término "anticuerpo monoclonal" o "MAB" se refiere a una población homogénea de anticuerpos capaces de unirse al mismo antígeno, por ejemplo, al mismo epítipo en el antígeno. Este término no está destinado a limitarse en lo que respecta a la fuente del anticuerpo o la manera en que se hace.

[0136] Para la producción de Mabs uno cualquiera de una serie de técnicas conocidas se pueden utilizar, tal como, por ejemplo, el procedimiento se ejemplifica en US4196265 o Harlow y Lane (1988), *supra*.

[0137] Por ejemplo, un animal adecuado se inmuniza con un inmunógeno en condiciones suficientes para estimular las células productoras de anticuerpos. Los roedores como conejos, ratones y ratas son animales ejemplares. Los ratones genéticamente diseñados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana y, por ejemplo, no expresan las proteínas de inmunoglobulina murina, también se pueden utilizar para generar un anticuerpo de la presente divulgación (por ejemplo, como se describe en WO2002/066630).

[0138] Después de la inmunización, las células somáticas con el potencial para producir anticuerpos, linfocitos específicamente B (células B), se seleccionan para su uso en el protocolo de generación de MAb. Estas células se pueden obtener de biopsias de bazo, amígdalas o ganglios linfáticos, o a partir de una muestra de sangre periférica. Las células B del animal inmunizado se fusionan entonces con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente derivado de la misma especie que el animal que fue inmunizado con el inmunógeno.

[0139] Los híbridos se amplifican por cultivo en un medio selectivo que comprende un agente que bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos en el medio de cultivo tisular. Agentes ejemplares son aminopterina, metotrexato y azaserina.

[0140] Los hibridomas amplificados se someten a una selección funcional para la especificidad del anticuerpo y/o título, tal como, por ejemplo, por citometría de flujo y/o inmunohistoquímica y/o inmunoensayo (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, ensayo de citotoxicidad, ensayo de placas, inmunoensayo de punto, y similares).

[0141] Alternativamente, la tecnología de ABL-MYC (NeoClone, Madison WI 53713, EE.UU.) se utiliza para producir líneas celulares que secretan MABs (por ejemplo, como se describe en Largaespada et al, J. Immunol Métodos. 197: 85-95, 1996).

[0142] Los anticuerpos también se pueden producir o aislar mediante el cribado de una biblioteca de presentación, por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos, por ejemplo, como se describe en US6300064 y/o US5885793.

[0143] En un ejemplo, el anticuerpo es 7G3, 6H6 o 9F5 como se describe en el documento US 6.177.078. Las versiones modificadas (por ejemplo, desimmunizadas quiméricas o humanizadas, tales como por los métodos descritos en el presente documento) de estos anticuerpos se contemplan también.

5 *Anticuerpos quiméricos*

[0144] La inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina sintética. En un ejemplo de un anticuerpo descrito en este documento es un anticuerpo quimérico. El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular (por ejemplo, murino, tales como ratón) correspondientes o pertenecientes a una determinada clase o subclase de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies (por ejemplo, primates, tales como humanos) correspondientes o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo. Típicamente anticuerpos quiméricos utilizan regiones de roedores o variables de conejo y de regiones constantes humanas, con el fin de producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se describen en, por ejemplo, US4816567; y US5807715.

[0145] La presente descripción también incluye una inmunoglobulina quimérica, por ejemplo, en la que una región variable de una especie se fusiona a una región de una proteína de otra especie. Por ejemplo, la divulgación contempla una inmunoglobulina que comprende una región variable de un receptor de células T de una especie fusionada a un dominio constante del receptor de células T de una especie separada.

Anticuerpos humanizados y humanos

[0146] Los anticuerpos de la presente descripción pueden ser humanizados o humanos.

[0147] El término "anticuerpo humanizado" se entenderá que se refiere a una subclase de anticuerpos quiméricos que tienen un sitio de unión de antígeno o región variable derivada de un anticuerpo de una especie no humana y la estructura de anticuerpo restante de la molécula sobre la base de la estructura y/o secuencia de un anticuerpo humano. El sitio de unión al antígeno comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo no humano injertado en FRs apropiadas en los dominios variables de un anticuerpo humano y las regiones restantes de un anticuerpo humano. Sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos.

[0148] Métodos para humanizar anticuerpos no humanos o partes de los mismos (por ejemplo, regiones variables) se conocen en la técnica. La humanización puede realizarse siguiendo el método de US5225539, o US5585089. No se excluyen otros métodos para la humanización de un anticuerpo.

[0149] El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento en relación con los anticuerpos se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables (por ejemplo, V_H, V_L) y, regiones opcionalmente constantes derivadas de o correspondientes a las secuencias que se encuentran en los seres humanos, por ejemplo, en la línea germinal humana o células somáticas. Los anticuerpos "humanos" pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas, por ejemplo, mutaciones introducidas por mutaciones dirigidas al azar o de sitio *in vitro* (en mutaciones particulares que implican sustituciones conservativas o mutaciones en un pequeño número de residuos del anticuerpo, por ejemplo en 1, 2, 3, 4 o 5 de los residuos del anticuerpo, por ejemplo, en 1, 2, 3, 4 o 5 de los residuos que forman una o más de las CDR del anticuerpo). Estos "anticuerpos humanos" en realidad no necesitan ser producidos por un ser humano, sino que pueden producirse usando medios recombinantes y/o aislados de un animal transgénico (por ejemplo, ratón) que comprende ácido nucleico que codifica un anticuerpo humano constante y/o regiones variables (por ejemplo, como se describen anteriormente). Los anticuerpos humanos pueden producirse usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (por ejemplo, como se describe en US5885793).

[0150] Los anticuerpos humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden también generarse usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque un anticuerpo seleccionado no humano monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (por ejemplo, como se describe en US5565332).

Los anticuerpos de-inmunizados y las inmunoglobulinas

[0151] La presente descripción también contempla un anticuerpo de-inmunizado o proteína. Anticuerpos y proteínas inmunizados tienen uno o más epítopos, por ejemplo, epítopos de células B o epítopos de células T removidos (es decir, mutados) para reducir por ello la probabilidad de que un mamífero elevará una respuesta inmune contra el anticuerpo o proteína. Los métodos para producir anticuerpos y proteínas de- inmunizados son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO00/34317, WO2004/10815 y WO2004/064724.

[0152] Los métodos para introducir mutaciones adecuadas y expresar y someter a ensayo la proteína resultante serán evidentes para el experto en la técnica basándose en la descripción en el presente documento.

Anticuerpos de cadena pesada

[0153] Los anticuerpos de cadena pesada difieren estructuralmente de muchas otras formas de anticuerpos, en la medida en que comprenden una cadena pesada, pero no comprenden una cadena ligera. En consecuencia, estas inmunoglobulinas se denominan también como "cadena pesada sólo anticuerpos". Inmunoglobulinas de cadena pesada se encuentran en, por ejemplo, camélidos y peces cartilaginosos (también llamados IgNAR).

[0154] Las regiones variables presentan en forma natural anticuerpos de cadena pesada que se denominan generalmente como "dominios V_{HH} " en anticuerpos de camélidos y V-NAR en IgNAR, con el fin de distinguirlos de las regiones variables de cadena pesada que están presentes en anticuerpos convencionales de 4 cadenas (a los que se hace referencia como "dominios V_H ") y de las regiones variables de cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (a las que se hace referencia como "dominios V_L ").

[0155] Una descripción general de anticuerpos de cadena pesada de camélidos y las regiones variables de los mismos y métodos para su producción y/o aislamiento y/o uso se encuentra *inter alia* en las siguientes referencias WO94/04678, WO97/49805 y WO 97/49805.

[0156] Una descripción general de las inmunoglobulinas de cadena pesada de peces cartilaginosos y las regiones variables de los mismos y métodos para su producción y/o aislamiento y/o uso se encuentra *inter alia* en el documento WO2005/118629.

Fragmentos de anticuerpo

Anticuerpos de único dominio

[0157] En algunos ejemplos, una inmunoglobulina 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 cadena polipeptídica única que comprende toda o una porción de la cadena pesada del dominio variable de un anticuerpo. En algunos ejemplos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, US6248516).

Diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos

[0158] En algunos ejemplos, una inmunoglobulina de la divulgación es o comprende un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo o superior complejo de proteínas fin tales como los descritos en el documento WO98/044001 y/o WO94/007921.

[0159] Por ejemplo, un diacuerpo es una proteína que comprende dos cadenas de polipéptido asociadas, cada cadena de polipéptido que comprende la estructura V_L - XV_H o V_H - XV_L , en la que V_L es una región variable de cadena ligera de anticuerpo, V_H es un anticuerpo de cadena pesada de la región variable, X es un enlazador que comprende los residuos suficientes para permitir la V_H y V_L en una única cadena polipeptídica para asociar (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 a antígeno, es decir, para formar una molécula Fv capaz de unirse específicamente a uno o más antígenos. La V_L y V_H pueden ser iguales en cada cadena de polipéptido o de la V_L y V_H pueden ser diferentes en cada cadena de polipéptido de modo que forme un diacuerpo biespecífico (es decir, que comprende dos Fv que tienen diferente especificidad).

[0160] Un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, etc capaz de inducir actividad efectora se pueden producir usando un dominio capaz de unirse a IL-3R α y un dominio de unión a antígeno de unión a antígeno capaz de unirse a una molécula de superficie celular en una célula inmune, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, CD3).

Fragmentos de Fv de única cadena (scFv)

[0161] El experto en la materia será consciente de que los scFv comprenden regiones V_H y V_L en una sola cadena de polipéptido y un enlazador polipeptídico entre la V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno (es decir, para la V_H y V_L de la cadena polipeptídica única de asociarse entre sí para formar un Fv). Por ejemplo, el enlazador comprende más de 12 residuos de aminoácidos con (Gly $_4$ Ser) $_3$ siendo uno de los enlazadores más favorecidos para un scFv.

[0162] La presente descripción también contempla un Fv estabilizado con disulfuro (o diFv o dsFv), en el que se introduce un único residuo de cisteína en un FR de V_H y un FR de V_L y los restos de cisteína unidos por un enlace de disulfuro para producir un Fv estable.

5 **[0163]** Alternativamente, o además, la presente descripción abarca un scFv dimérico, es decir, una proteína que comprende dos moléculas de scFv unidos 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 enlazador peptídico de longitud suficiente para permitir que los dos scFv para formar y para unirse a un antígeno, como se describe en US2 0060263367.

10 **[0164]** La presente descripción también contempla un scFv dimérico capaz de inducir la actividad efectora. Por ejemplo, un scFv se une a IL-3R α y otro scFv se une a una molécula de superficie celular en una célula inmune, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, CD3). 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

15 **[0165]** La presente descripción también contempla otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tales como:

- (i) las proteínas biespecíficas "llave y agujero" como se describen en US5,731,168;
- (ii) proteínas heteroconjugadas, por ejemplo, como se describe en US4,676,980;
- (iii) proteínas heteroconjugadas se producen utilizando un reticulador químico, por ejemplo, como se describe en 20 US4,676,980; y
- (iv) Fab₃ (por ejemplo, como se describe en EP19930302894).

Regiones Fc

25 **[0166]** La presente descripción abarca inmunoglobulinas que comprenden una región Fc de un anticuerpo, incluyendo fragmentos de unión a antígeno de una inmunoglobulina fusionada a un Fc.

30 **[0167]** Las secuencias de las regiones Fc útiles para producir las proteínas de la presente descripción se pueden obtener de un número de diferentes fuentes. En algunos ejemplos, la Fc o parte del mismo de la proteína se deriva de un anticuerpo humano. Además, el Fc o parte del mismo se pueden derivar de cualquier clase de anticuerpos, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo de anticuerpo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En un ejemplo, el Fc es IgG1 humana de isotipo IgG2 o isotipo IgG3 humano o isotipo humano o un híbrido de cualquiera de los anteriores.

35 **[0168]** En un ejemplo, la región Fc es capaz de inducir una función efectora. Por ejemplo, la región Fc es una región Fc de IgG1 o IgG3 humana. En otro ejemplo, la región Fc es un híbrido de una IgG1 y una región Fc de IgG2 o un híbrido de una región Fc IgG1 e IgG3 o un híbrido de una región Fc IgG2 y IgG3. Híbridos ejemplares de regiones Fc IgG2 y IgG1 humana se describen en Chappel et al., Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 88: 9036-9040, 1991.

40 **[0169]** Los métodos para la determinación de si una región Fc puede o no inducir que la función efectora sea evidente para el experto en la técnica y/o descrita en el presente documento.

Función efectora

45 **[0170]** De manera adecuada, una inmunoglobulina anti-IL-3R α adecuada para su uso en los métodos de la presente descripción tiene o muestra una función efectora que facilita o permite al menos el agotamiento parcial, el agotamiento sustancial o eliminación de células dendríticas plasmocitoides IL-3R α^+ . Tal función efectora puede mejorar la afinidad de unión a los receptores Fc, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente de 50 complemento (CDC).

[0171] Como será evidente para el experto en la técnica basándose en la descripción en el presente documento, algunos ejemplos de la presente descripción hacen uso de una inmunoglobulina capaz de inducir la función efectora.

55 **[0172]** En un ejemplo, la inmunoglobulina se une a IL-3R α de una manera tal que es capaz de inducir una función efectora, tal como, ADCC.

[0173] En un ejemplo, la inmunoglobulina se une a un epítipo dentro de IL-3R α que le permita inducir una función efectora, tal como ADCC.

60 **[0174]** En otro ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de unirse a IL-3R α en un pDC y/o un basófilo en un mamífero para inducir de ese modo una función efectora, tal como ADCC.

65 **[0175]** Por ejemplo, la inmunoglobulina permanece unida a IL-3R α en la superficie de la célula durante un tiempo suficiente para inducir una función efectora, tal como ADCC. Por ejemplo, la inmunoglobulina no se internaliza demasiado rápidamente para permitir que la ADCC se induzca.

[0176] Alternativamente, o además, la inmunoglobulina se une a las IL-3R α en la superficie de la célula de una manera que permite que una célula efectora inmune se una a una región Fc en la inmunoglobulina e induzca una función efectora, tal como ADCC. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina se expone de tal manera que la inmunoglobulina se une a la IL-3R α que es capaz de interactuar con un receptor de Fc (por ejemplo, un Fc γ R) 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.

[0177] Cada uno de los párrafos anteriores relacionados con las funciones efectoras de una inmunoglobulina se tendrán que aplicar, *mutatis mutandis*, a la inducción de CDC. Por ejemplo, la inmunoglobulina se une a las IL-3R α en la superficie de la célula en un componente de una manera que permita que el componente de complemento C1q se una a una región Fc en la inmunoglobulina e induzca CDC.

[0178] En un ejemplo, la inmunoglobulina es capaz de inducir un nivel mejorado de la función efectora.

[0179] En un ejemplo, el nivel de la función efectora inducida por la región Fc se mejora con relación a una región Fc de tipo salvaje de un anticuerpo IgG1 o una región Fc de tipo salvaje de un anticuerpo IgG3.

[0180] En otro ejemplo, la región Fc se modifica para aumentar el nivel de la función efectora que es capaz de inducción en comparación con la región Fc sin la modificación. Tales modificaciones pueden estar en el nivel de aminoácido y/o el nivel estructural secundario y/o el nivel estructural terciario y/o a la glicosilación de la región Fc.

[0181] En un ejemplo, una inmunoglobulina de anticuerpo anti-IL-3R α tiene o muestra un nivel de función efectora que es mayor que el exhibido por ch7G3 (una versión quimérica de 7G3 que comprende una región Fc de IgG1 humana de tipo salvaje, se refiere como CSL360 en la publicación internacional WO2009/070844) o hz7G3 (una versión humanizada de 7G3 que comprende una región Fc de tipo salvaje de IgG1 humana). En el contexto de la presente divulgación, ch7G3 y hz7G3 exhiben esencialmente el mismo nivel de la función efectora.

[0182] El experto apreciará que una mayor función efectora se manifieste en cualquiera de un número de maneras, por ejemplo como un mayor nivel de efecto, un efecto más sostenido o un ritmo más rápido del efecto.

[0183] Por ejemplo, la inmunoglobulina anti-IL-3R α tiene o muestra una función efectora que incluye la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC).

[0184] En un ejemplo, la región Fc comprende una o más modificaciones de aminoácidos que aumentan su capacidad de inducir una mayor función defectora. En un ejemplo, la región Fc se une con mayor afinidad a uno o más Fc γ Rs. En un ejemplo, la región Fc tiene una afinidad por un Fc γ R que es más que 1 vez mayor que la de una región Fc de tipo silvestre o más de 5 veces mayor que la de una región Fc de tipo salvaje o entre 5 veces y 300 veces mayor que la de una región Fc de tipo salvaje. En un ejemplo, la región Fc comprende la sustitución de al menos un ácido amino en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en: 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 Kabat de la UE. En un ejemplo, la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: 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, numerados según el índice de Kabat de la UE. En un ejemplo, la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en 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, numerados según el índice de Kabat de la UE.

[0185] En otro ejemplo, la región Fc se une a Fc \odot RIIIa más eficiente que a Fc γ RIIb. Por ejemplo, la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en: 234, 235, 239, 240, 264, 296, 330, y I332, numerados de acuerdo con el índice de Kabat de la UE. En un ejemplo, la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: L234Y,

L234I, L235I, S239D, S239E, S239N, S239Q, V240A, V240M, V264I, V264Y, Y296Q, A330L, A330Y, A330I, I332D, y I332E, numerados de acuerdo con el índice de Kabat de la UE. Por ejemplo, la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 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, numerados según el índice de Kabat de la UE.

[0186] En un ejemplo adicional, la región Fc induce ADCC en un nivel mayor que la mediada por una región Fc de tipo salvaje. Por ejemplo, la región Fc induce ADCC en un nivel que es más de 5 veces o entre 5 veces y 1.000 veces mayor que la inducida por una región Fc de tipo salvaje. En un ejemplo, la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en: 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 Kabat de la UE. En un ejemplo, la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: 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, numerados según el índice de Kabat de la UE. En un ejemplo, la región Fc comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: 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, numerados según el índice de Kabat de la UE.

[0187] En un ejemplo, la región Fc comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos S239D/I332E, numerados de acuerdo con el índice de Kabat de la UE. Esta región Fc tiene alrededor de 14 veces de incremento en la afinidad por FcγRIIIa en comparación con una región Fc de tipo salvaje y aproximadamente 3,3 mayor capacidad para inducir ADCC en comparación con una región Fc de tipo salvaje.

[0188] En un ejemplo, la región Fc comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos S239D/A330L/I332E, numerados de acuerdo con el índice de Kabat de la UE. Esta región Fc tiene alrededor de 138 veces de incremento en la afinidad por FcγRIIIa en comparación con una región Fc de tipo salvaje y un aumento de la capacidad de aproximadamente 323 para inducir ADCC en comparación con una región Fc de tipo salvaje.

[0189] Las sustituciones de aminoácidos adicionales que aumentan la capacidad de una región Fc de inducir la función efectora son conocidas en la técnica y/o descritas, por ejemplo, en US6737056 o US7317091.

[0190] En un ejemplo, la glicosilación de la región Fc se altera para aumentar su capacidad de inducir la función efectora mejorada. A este respecto, los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido ramificado, biantenarico que está generalmente unido por una N-vinculación a Asn297 del dominio C_{H2} de la región Fc. El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, glucosamina de N-acetilo (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a GlcNAc en el "tronco" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos ejemplos, las regiones Fc de acuerdo con 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 es "afucosilada". Tales variantes pueden tener una capacidad mejorada para inducir ADCC. Métodos para producir anticuerpos afucosilados incluyen, expresando la inmunoglobulina en una línea celular incapaz de expresar (-1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (por ejemplo, como se describe en Yumane-Ohnuki et al, Biotechnol Bioengineer, 87: 614- 622, 2004), que expresan la inmunoglobulina en células que expresan un pequeño ARN de interferencia contra FUT8 (por ejemplo, como se describe en Mori et al, Biotechnol Bioengineer, 88: 901-908, 2004), que expresan la inmunoglobulina en las células incapaces de expresar difosfato de guanosa (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 que tienen un nivel reducido de fucosilación, por ejemplo, producido usando una línea celular modificada para expresar ©-(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III) (por ejemplo, como se describe en Umana et al., Nat Biotechnol., 17: 176-180, 1999).

[0191] En un ejemplo, una inmunoglobulina de acuerdo con la presente descripción se afucosila. Por ejemplo, la

inmunoglobulina se produce en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula CHO) que no expresa FUT8.

5 [0192] Otros métodos incluyen el uso de líneas celulares que producen anticuerpos inherentemente capaces de inducir la función efectora mediada por Fc mejorada (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).

10 [0193] Las inmunoglobulinas útiles en los métodos de la presente descripción también incluyen aquellas con oligosacáridos bisectados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc es atravesado por GlcNAc. Tales inmunoglobulinas pueden haber reducido fucosilación y/o mejora de la función de ADCC. Ejemplos de tales inmunoglobulinas se describen, por ejemplo, en US6602684 y US20050123546.

15 [0194] También se contemplan inmunoglobulinas con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales inmunoglobulinas pueden haber mejorado la función CDC. Tales inmunoglobulinas se describen, por ejemplo, en WO1997/30087 y WO1999/22764.

20 [0195] Ejemplos no limitativos de inmunoglobulinas que muestran la actividad ADCC incluyen los anticuerpos monoclonales designados en el presente documento como "hz7G3V1", "hz7G3V2" y "hz7G3V3". En cada caso el nivel de la función efectora exhibida por estas inmunoglobulinas se mejora con relación a, o mayor que la de ch7G3 (una forma quimérica de 7G3 que comprende una región Fc de IgG1 humana de tipo salvaje) o hz7G3.

25 [0196] En otro ejemplo no limitante, una inmunoglobulina de anti-IL-3R α puede producirse *de novo* teniendo una función efectora mejorada, tales como la función de ADCC mejorada, como resultado de unirse a un epítipo diferente o que tiene una cinética de internalización más lenta (por ejemplo, en comparación con ch7G3 o hz7G3).

[0197] Los métodos para determinar la capacidad de una inmunoglobulina para inducir la función efectora y conocida en la técnica y/o descrita en más detalle en este documento.

30 Modificaciones adicionales

[0198] La presente descripción también contempla modificaciones adicionales a una inmunoglobulina.

35 [0199] Por ejemplo, la inmunoglobulina comprende una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la vida media de la inmunoglobulina. Por ejemplo, la inmunoglobulina comprende una región Fc que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la afinidad de la región Fc para la región Fc neonatal (FcRn). Por ejemplo, la región Fc tiene afinidad incrementada por FcRn a pH más bajo, por ejemplo, aproximadamente pH 6,0, para facilitar la Fc/FcRn de unión en un endosoma. En un ejemplo, la región Fc ha incrementado la afinidad para FcRn a aproximadamente pH 6 en comparación con su afinidad a un pH de 7,4, lo que facilita la re-liberación de Fc en sangre después del reciclaje de las células. Estas sustituciones de aminoácidos son útiles para la ampliación de la vida media de una inmunoglobulina, mediante la reducción de aclaramiento de la sangre.

45 [0200] Las sustituciones de aminoácidos ejemplares incluyen T250Q y/o M428L de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat. Las sustituciones de aminoácidos adicionales o alternativos se describen, por ejemplo, en US20070135620.

Producción de proteínas

50 [0201] En un ejemplo, una inmunoglobulina descrita en este documento de acuerdo con cualquier ejemplo se produce mediante el cultivo de un hibridoma en condiciones suficientes para producir la inmunoglobulina, por ejemplo, como se describe en el presente documento y/o como se conoce en la técnica.

Expresión recombinante

55 [0202] En otro ejemplo, una inmunoglobulina descrita en este documento de acuerdo con cualquier ejemplo es recombinante.

60 [0203] En el caso de una proteína recombinante, el ácido nucleico que la codifica se puede clonar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como *E. coli*, células de levadura, células de insecto, o células de mamífero, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK), o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina de otro modo. Los ejemplos de células utilizadas para la expresión de una inmunoglobulina son células CHO, células de mieloma o células HEK. 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 Pub. Associates and 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). Una amplia variedad de clonación y

métodos *en vitro* de amplificación son apropiados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Los métodos para producir anticuerpos recombinantes también se conocen en la técnica. Véase, US4,816,567 o US5530101.

5 **[0204]** Tras aislamiento, el ácido nucleico se inserta operativamente unido a un promotor en un vector de expresión o constructo de expresión para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión en un sistema libre de células o en células.

10 **[0205]** Tal como se utiliza aquí, el término "promotor" ha de tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras de la transcripción de un gen genómico, incluyendo la caja TATA o elemento de iniciador, que se requiere para la iniciación de la transcripción exacta, con o sin elementos reguladores adicionales (por ejemplo, secuencias de activación aguas arriba, factor de transcripción de sitios de unión, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo, en respuesta a un estímulo de desarrollo y/o externo, o de una manera específica de tejido. En el presente contexto, el término "promotor" se utiliza también para describir un recombinante, ácido nucleico sintético o de fusión, o un derivado que confiere, activa o mejora la expresión de un ácido nucleico al que está ligado operativamente. Promotores ejemplares pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos para mejorar adicionalmente la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o expresión temporal de dicho ácido nucleico.

20 **[0206]** Tal como se utiliza aquí, el término "unido operativamente a" significa la colocación de un promotor en relación con un ácido nucleico de tal manera que la expresión del ácido nucleico está controlada por el promotor.

25 **[0207]** Muchos vectores para la expresión en células están disponibles. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, una secuencia que codifica una inmunoglobulina (por ejemplo, derivado de la información proporcionada en este documento), un elemento potenciador, un promotor, y una terminación de la transcripción secuencia. El experto en la materia será consciente de secuencias adecuadas para la expresión de una inmunoglobulina. Secuencias de señal de ejemplo incluyen señales de secreción procarióticas (por ejemplo, pelB, fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II estable al calor) señales de secreción de levadura (por ejemplo, líder de invertasa, líder del factor ζ , o líder de fosfatasa ácida) o señales de secreción de mamífero (por ejemplo, señal gD de herpes simplex).

30 **[0208]** Promotores ejemplares activos en células de mamífero incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE), el factor de elongación humano promotor 1- α (EF1), los pequeños promotores de ARN nuclear (U1A y U1b), promotor de cadena pesada (ζ -miosina, promotor de virus simio 40 (SV40), promotor de virus del sarcoma Rous (RSV), el promotor tardío principal de adenovirus, promotor de β -actina; elemento regulador híbrido que comprende un promotor de CMV/promotor de β -actina o un promotor de inmunoglobulina o fragmento activo. Ejemplos de líneas celulares de 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 (células 293 o 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).

35 **[0209]** Los promotores típicos adecuados para la expresión en células de levadura, tales como por ejemplo una célula de levadura seleccionada de entre el grupo que comprende *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe*, incluyen, pero no se limitan a, el promotor *ADH1*, el promotor *GAL1*, el promotor *GAL4*, el promotor *CUP1*, el promotor *PHO5*, el promotor *NMT*, el promotor *RPR1*, o el promotor *TEF1*.

45 **[0210]** Los medios para la introducción de ácido nucleico aislado o construcción de expresión que comprende el mismo en una célula para la expresión se conocen 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 las células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, tales como mediante el uso de lipofectamina (Gibco, MD, EE.UU.) y/o Cellfectina (Gibco, MD, EE.UU.), absorción de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo con micropartículas tales como mediante el uso de partículas de tungsteno u oro revestidas de ADN (Agracetus Inc., WI, EE.UU.), entre otros.

50 **[0211]** Las células huésped utilizadas para producir la inmunoglobulina pueden cultivarse en una variedad de medios, dependiendo del tipo de célula utilizado. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPM1-1640 (Sigma), y Dulbecco Modified Eagle Medium ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células de mamífero. Medios para el cultivo de otros tipos de células descritas en este documento son conocidos en la técnica.

60 Aislamiento de proteínas

[0212] Los métodos para la purificación de una inmunoglobulina se conocen en la técnica y/o se describen en el presente documento.

65

[0213] Cuando una inmunoglobulina se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión son generalmente concentrados primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF se puede incluir en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

[0214] La inmunoglobulina preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, intercambio iónico, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o cromatografía de proteína G), o cualquier combinación de los anteriores. 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).

[0215] El experto en la técnica también será consciente de que una inmunoglobulina se puede modificar para incluir una etiqueta para facilitar la purificación o la detección, por ejemplo, una etiqueta de polihistidina, por ejemplo, una etiqueta de hexa-histidina, o una etiqueta de hemaglutinina del virus de influenza (HA) o una etiqueta de Virus de Simio 5 (V5), o una etiqueta FLAG, o una etiqueta de S-transferasa de glutatión (GST). La inmunoglobulina resultante se purifica después usando métodos conocidos en la técnica, tales como, purificación por afinidad. Por ejemplo, una inmunoglobulina que comprende una etiqueta de hexa-su se purifica poniendo en contacto una muestra que comprende la inmunoglobulina con ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) que se une específicamente a la etiqueta hexa-su inmovilizada sobre un soporte sólido o semi-sólido, el lavado de la muestra para eliminar la inmunoglobulina no unida, y posteriormente eluir la inmunoglobulina unida. Alternativamente, o además de un ligando o anticuerpo que se une a una etiqueta se utiliza en un método de purificación por afinidad.

Ensayo de la actividad de una inmunoglobulina

La determinación de la unión competitiva

[0216] Los ensayos para la determinación de una inmunoglobulina que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3 será evidente para el experto en la materia. Por ejemplo, 7G3 se conjuga con una etiqueta detectable, por ejemplo, un marcador fluorescente o un marcador radiactivo. El anticuerpo marcado y la inmunoglobulina de ensayo se mezclan y se ponen en contacto con IL-3R α o un epítipo del mismo o una célula que expresa el mismo. El nivel de 7G3 marcado se determina entonces y se compara con el nivel determinado cuando el anticuerpo marcado se pone en contacto con el IL-3R α , epítipo o células en ausencia de la inmunoglobulina. Si el nivel de 7G3 marcado se reduce en presencia de la inmunoglobulina de ensayo en comparación con la ausencia de la inmunoglobulina, la inmunoglobulina se considera que inhibe competitivamente la unión del 7G3 a IL-3R α .

[0217] Opcionalmente, la inmunoglobulina de ensayo se conjuga con etiqueta diferente a 7G3. Este etiquetado alternativo permite la detección del nivel de unión de la inmunoglobulina de prueba a IL-3R α o el epítipo o célula.

[0218] En otro ejemplo, se permite que la inmunoglobulina se una a IL-3R α antes de contactar con la IL-3R α con 7G3. Una reducción en la cantidad de límite 7G3 en presencia de la inmunoglobulina en comparación con la ausencia de la inmunoglobulina indica que la inmunoglobulina inhibe competitivamente la unión 7G3 a IL-3R α . Un ensayo recíproco también se puede realizar utilizando inmunoglobulina marcada y primero permitiendo 7G3 para unirse a IL-3R α . En este caso, una cantidad reducida de inmunoglobulina marcada unida a IL-3R α en presencia de 7G3 en comparación con la ausencia de 7G3 indica que la inmunoglobulina inhibe competitivamente la unión de 7G3 a IL-3R α .

[0219] En otro ejemplo, el epítipo unido por la inmunoglobulina se establece para determinar si es el mismo o se solapa con el epítipo unido por 7G3. Métodos de mapeo de epítopos serán evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, una serie de péptidos solapantes que abarcan la secuencia IL-3R α , por ejemplo, péptidos que comprenden 10 a 15 aminoácidos se producen. La inmunoglobulina se pone en contacto con cada péptido y se determina el péptido al que se une. Esto permite la determinación de péptido que comprende el epítipo al que se une la inmunoglobulina. Si varios péptidos no contiguos están obligados por la inmunoglobulina, la inmunoglobulina puede unirse a un epítipo conformacional.

[0220] Alternativamente, o en adición, los residuos de aminoácidos dentro de IL-3R α están mutados, por ejemplo, mediante mutagénesis de barrido de alanina, y las mutaciones que reducen o impiden la inmunoglobulina y/o unión de 7G3 se determinan. Es probable que cualquier mutación que reduce o evita la unión de la inmunoglobulina sea dentro del epítipo unido por la inmunoglobulina.

[0221] Alternativamente, o además, la inmunoglobulina se produce utilizando el epítipo al que se une el 7G3, y por lo tanto es probable que se unan al mismo epítipo.

[0222] Opcionalmente, la disociación constante (Kd) de una inmunoglobulina para IL-3R α o un epítipo del mismo se

determina. El "Kd" o "valor de Kd" para una inmunoglobulina de unión IL-3R α es en un ejemplo medido por un ensayo de unión IL-3R α radiomarcado (RIA). Este ensayo equilibra la inmunoglobulina con una concentración mínima de IL-3R α radioactivo en presencia de una serie de titulación de IL-3R α no marcado. Tras el lavado para eliminar IL-3R α no unido, la cantidad de radiactividad se determina, lo cual es indicativo de la Kd de la proteína.

5 **[0223]** De acuerdo con otro ejemplo, el Kd o valor de Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmones de superficie, por ejemplo, utilizando resonancia de plasmón superficial BIAcore (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) con IL-3R α inmovilizado.

10 **[0224]** En algunos ejemplos, se seleccionan las proteínas que tienen una Kd similar o una Kd mayor que 7G3, porque es probable que compitan por la unión a IL-3R α .

Determinación de la neutralización

15 **[0225]** En algunos ejemplos de la presente descripción, una inmunoglobulina es capaz de neutralizar la señalización de IL-3.

[0226] Varios ensayos son conocidos en la técnica para la evaluación de la capacidad de una inmunoglobulina para neutralizar la señalización de un ligando a través de un receptor.

20 **[0227]** En un ejemplo, la inmunoglobulina reduce o evita la unión de IL-3 a la cadena 3R α y/o un heterodímero de cadena IL-3R α y cadena IL-3R β . Estos ensayos pueden realizarse como un ensayo de unión competitiva como se describe en el presente documento usando la IL-3 marcado y/o inmunoglobulina etiquetada.

25 **[0228]** En otro ejemplo, la inmunoglobulina reduce o impide liberación de histamina mediada por IL-3 de los basófilos. Por ejemplo, los leucocitos de baja densidad que comprenden basófilos se incuban con IgE, IL-3 y diversas concentraciones de la inmunoglobulina. Las células de control no comprenden inmunoglobulina (control positivo) o IL-3 (control negativo). El nivel de histamina liberada se evalúa a continuación, utilizando una técnica estándar, por ejemplo, RIA. Una inmunoglobulina que reduce el nivel de la liberación de histamina a un nivel menor que el control positivo se considera para neutralizar la señalización de IL-3. En un ejemplo, el nivel de reducción se correlaciona con la concentración de inmunoglobulina. Se describe un procedimiento ejemplar para evaluar la liberación de histamina mediada por IL-3, por ejemplo, en López et al., J. Cell. Physiol., 145: 69, 1990.

35 **[0229]** En un ejemplo adicional, la inmunoglobulina 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, 24-48 horas). Después, las células se cultivaron en presencia de IL-3 y diversas concentraciones de la inmunoglobulina. Las células de control no comprenden inmunoglobulina (control positivo) o IL-3 (control negativo). La proliferación celular se evalúa a continuación, utilizando una técnica estándar, por ejemplo, incorporación de 3H-timidina. Una inmunoglobulina que reduce o previene la proliferación de células en presencia de IL-3 a un nivel menor que el control positivo se considera para neutralizar la señalización de IL-3.

40 **[0230]** Otro ensayo para la evaluación de IL-3 de neutralización de señalización comprende la determinación de si o no la inmunoglobulina reduce o evita los efectos mediados por IL-3 en las células endoteliales. Por ejemplo, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) se cultivan en presencia de IL-3 (opcionalmente, con IFN- γ) y diversas concentraciones de la inmunoglobulina. Se evalúa la cantidad de IL-6 secretada, por ejemplo, usando un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Las células de control no comprenden inmunoglobulina (control positivo) o IL-3 (control negativo). Una inmunoglobulina que reduce o evita la producción de IL-6 en presencia de IL-3 a un nivel menor que el control positivo se considera para neutralizar la señalización de IL-3.

50 **[0231]** Otros métodos de evaluación de la neutralización de señalización de IL-3 se contemplan por la presente divulgación.

Determinación de la función efectora

55 **[0232]** Los métodos para la evaluación de la actividad ADCC son conocidos en la técnica.

[0233] En un ejemplo, el nivel de actividad ADCC se evaluó a través de un ensayo de liberación de ^{51}Cr , un ensayo de liberación de europio o un ensayo de liberación ^{35}S . En cada uno de estos ensayos, las células que expresan IL-3R α se cultivan con uno o más de los compuestos citados durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que el compuesto se absorba por la célula. En el caso de un ensayo de liberación de ^{35}S , las células que expresan IL-3R α pueden cultivarse con metionina etiquetada con ^{35}S y/o cisteína durante un tiempo suficiente para que los aminoácidos marcados se incorporen en las proteínas recién sintetizadas. Después las células se cultivaron en presencia o ausencia de la inmunoglobulina y en presencia de células efectoras inmunes, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (células PBMC) y/o NK. La cantidad de ^{51}Cr , europio y/o ^{35}S se detecta en medio de cultivo celular, y un aumento de la presencia de la inmunoglobulina en comparación con en la ausencia de

65

inmunoglobulina indica que la inmunoglobulina tiene una función efectora. Publicaciones que describen ejemplos de ensayos para evaluar el nivel de ADCC inducida por una inmunoglobulina incluyen Hellstrom, et al. Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 83: 7059-7063, 1986 y Bruggemann, et al., J. Exp. Medicina. 166: 1351-1361, 1987.

5 **[0234]** Otros ensayos para evaluar el nivel de ADCC inducido por una inmunoglobulina incluyen el ensayo de citotoxicidad no radiactiva ACT1™ por citometría de flujo (CellTechnology, Inc. CA, EE.UU.) o ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, WI, EE.UU.).

10 **[0235]** Alternativamente, o adicionalmente, la función efectora de una inmunoglobulina se evalúa mediante la determinación de su afinidad por una o más de FcγRs, por ejemplo, como se describe en US7317091.

[0236] Los ensayos de unión C1q también pueden llevarse a cabo para confirmar que la inmunoglobulina es capaz de unirse a C1q y pueden inducir CDC. Para evaluar la activación del complemento, un ensayo CDC se puede realizar (véase, por ejemplo, Gazzano-Sant oro et al, J. Immunol. Methods 202: 163, 1996.

15 Evaluación de la eficacia terapéutica

Ensayos in vitro

20 **[0237]** Varios ensayos *in vitro* están disponibles para evaluar la capacidad de una inmunoglobulina para el tratamiento de una enfermedad o afección descrita en esta memoria, por ejemplo, lupus.

25 **[0238]** Por ejemplo, pDC y/o basófilos o poblaciones de células que comprenden los mismos (por ejemplo, PBMC) son cultivados en presencia o ausencia de una inmunoglobulina y un inductor de las células que se produce en una enfermedad o condición (por ejemplo, oligonucleótidos CpG y/o complejos inmunológicos en el caso de lupus). Se evalúa la eficacia de la inmunoglobulina en el tratamiento de la enfermedad o condición, entonces, por ejemplo, determinando el nivel de IFNα secretadas en medio de cultivo celular usando un ELISA. Alternativamente, o además se evalúa el nivel de secreción de histamina o secreción de IL-4, IL-6 y/o IL-13. Una reducción en el nivel de cualquiera de estas citocinas en comparación con en ausencia de inmunoglobulina (o en presencia de una inmunoglobulina de control de isotipo) indica que la inmunoglobulina es adecuada para el tratamiento de la enfermedad o condición. Alternativamente, o además, se evalúa el nivel de muerte celular. Un aumento en la muerte celular (en particular, pDC y/o muerte celular de basófilos en la ausencia de un aumento detectable en la muerte de otros tipos celulares por encima del fondo) es indicativo de una inmunoglobulina adecuada para el tratamiento de la enfermedad o condición. A este respecto, como se ha discutido anteriormente en este documento, se considera que las citoquinas tales como IFNα juegan un papel en algunas enfermedades/condiciones, por ejemplo, lupus. En consecuencia, se considera que una inmunoglobulina que reduce la producción IFNα es adecuada para el tratamiento de tales condiciones.

40 *Ensayos in vivo*

[0239] En un ejemplo, la eficacia de una inmunoglobulina para tratar una enfermedad o condición se evalúa utilizando un ensayo *in vivo*.

45 **[0240]** Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a un animal no humano (por ejemplo, un primate no humano) y se evalúa el número/nivel de pDC y/o basófilos en circulación. Una inmunoglobulina que reduce el número/nivel de pDC y/o basófilos en comparación con antes de la administración y/o en un mamífero de control al que la inmunoglobulina no se ha administrado se considera adecuado para el tratamiento de la enfermedad o condición.

50 **[0241]** En otro ejemplo, el nivel de una citocina, tal como IFNα se detecta en la circulación de un mamífero, por ejemplo, usando un ELISA. Una inmunoglobulina 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 no se ha administrado la inmunoglobulina se considera adecuada para tratar la enfermedad o condición. Al considerarse que citoquinas tales como IFNα juegan un papel en algunas enfermedades/condiciones, por ejemplo, lupus, una inmunoglobulina que reduce la producción IFNα se considera que es adecuada para el tratamiento de tales condiciones.

55 **[0242]** En otro ejemplo, una inmunoglobulina se administra a un mamífero no humano (por ejemplo, primate no humano,) modelo de lupus. Por ejemplo, el plasma de seres humanos que padecen LES se infunde en primates no humanos, tales como monos cynomolgus, por un tiempo y bajo condiciones suficientes para producir un modelo de LES (por ejemplo, como se describe en Pincus et al., Clin. Immunol., 105: 141-154, 2002). La inmunoglobulina se administra a los primates no humanos y se evalúa su efecto sobre los síntomas de LES, por ejemplo, usando un ensayo descrito en el presente documento. Por ejemplo, se evalúa el nivel de anticuerpos anti-ADNs y/o complejos inmunes. Una inmunoglobulina que reduce uno o más síntomas de LES se considera adecuada para el tratamiento de LES.

65 **Condiciones que deben tratarse**

[0243] Las enfermedades o afecciones a ser tratadas por el método de la presente invención están típicamente asociadas con o son en parte causadas o mediadas por interferones de tipo I y/o son sensibles al agotamiento, la eliminación o, eliminación al menos parcial de las células dendríticas que producen interferones de tipo I y/o basófilos. De manera adecuada, la enfermedad o afección se selecciona entre lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren y esclerodermia incluyendo esclerodermia sistémica (SSc).

[0244] En un ejemplo, la enfermedad o afección es lupus. Por ejemplo, la enfermedad o afección es el lupus discoide, lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus inducido por fármacos, lupus neonatal, la nefritis por lupus o LES.

[0245] Una enfermedad o condición particular es el LES.

[0246] En un ejemplo, el LES es LES seronegativo, es decir, no se caracteriza por autoanticuerpos. En consecuencia, en un ejemplo, un método de la presente descripción comprende además la identificación de un mamífero que padece de LES seronegativos, por ejemplo, mediante la detección de la ausencia de autoanticuerpos tales como los descritos en el presente documento.

[0247] En otro ejemplo, el LES es LES seropositivo. Por ejemplo, el LES se caracteriza por auto-anticuerpos, tales como, anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-C1q, anti-ADN de doble cadena (ADNds), anticuerpos anti-Sm, anticuerpos ribonucleoproteicos antinucleares, anticuerpos antifosfolípidos, anticuerpos anti-ribosomales P, anticuerpos anti-Ro/SS-A, anticuerpos anti-Ro, y anticuerpos anti-La. En consecuencia, en un ejemplo, un método de la presente descripción comprende además la identificación de un mamífero que sufre de LES seropositivos, por ejemplo, mediante la detección de la presencia de autoanticuerpos tales como los descritos en el presente documento.

[0248] Métodos para la detección de autoanticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, una muestra de suero o plasma de un sujeto se pone en contacto con un antígeno, por ejemplo, ADN de doble cadena durante un tiempo y en condiciones suficientes para la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Los complejos resultantes se ponen en contacto con un anticuerpo marcado capaz de unirse a un anticuerpo de mamífero (por ejemplo, un anticuerpo anti-Fc) durante un tiempo y bajo condiciones para la formación de un complejo y la cantidad de marcador detectada. La detección de la etiqueta indica la presencia del autoanticuerpo.

[0249] Los métodos descritos en este documento de acuerdo con cualquiera ejemplo, además, pueden comprender la selección de un mamífero para el tratamiento sobre la base de tener una enfermedad o condición o estar en riesgo de desarrollar una recaída de la enfermedad o condición. Ejemplos particulares de tales condiciones y enfermedades se han descrito anteriormente.

[0250] Por ejemplo, un individuo que tiene lupus o en riesgo de desarrollar lupus o una recaída de la misma pueden identificarse en base a la detección de autoanticuerpos, por ejemplo, como se describe anteriormente.

[0251] El diagnóstico del LES adicional o alternativamente puede ser de acuerdo con los criterios actuales del American College of Rheumatology (ACR) y/o enfermedad activa puede definirse por un criterio "A" del British Isles Lupus Activity Group (BILAG) o dos criterios "B" del BILAG y/o por la European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM) y/o por el Índice de Actividad de Lupus (LAI) y/o por la Puntuación de Índice de LES de los Institutos Nacionales de Salud (SIS) y/o por la Medida de Actividad de Lupus Sistémico (SLAM) y/o por el índice de actividad de la enfermedad LES (SLEDAI). Algunos signos, síntomas, u otros indicadores que se utilizan para diagnosticar el LES adaptado de Tan et al. Arth Rheum 25, 1982 puede ser eritema malar, tales como erupción cutánea en las mejillas, erupción discoide, o parches rojos, fotosensibilidad tal como la reacción a la luz solar, lo que resulta en el desarrollo de o aumento de la erupción de la piel, úlceras orales, tales como úlceras en la nariz o la boca, artritis, tales como la artritis no erosiva que implica dos o más articulaciones periféricas (artritis en la que los huesos alrededor de las articulaciones no se destruyen), serositis, pleuritis o pericarditis, trastorno renal, tales como exceso de proteínas en la orina (mayor de 0,5 gm/día o 3⁺ en varillas de prueba) y/o cilindros celulares (elementos anormales derivadas de la orina y/o glóbulos blancos y/o las células del túbulo renal), signos neurológicos, síntomas, u otros indicadores, ataques (convulsiones), y/o psicosis en ausencia de drogas o trastornos metabólicos que se sabe que causan efectos secundarios, y los signos, síntomas hematológicos, u otros indicadores tales como la anemia hemolítica o leucopenia (conteo sanguíneo blanco debajo de 4.000 células por milímetro cúbico) o linfopenia (menos de 1.500 linfocitos por milímetro cúbico) o trombocitopenia (menos de 100.000 plaquetas por milímetro cúbico). La leucopenia y linfopenia deben detectarse en dos o más ocasiones. La trombocitopenia se debe detectar en ausencia de fármacos conocidos para inducir la misma. La presente descripción no se limita a estos signos, síntomas, u otros indicadores de lupus.

[0252] En un ejemplo, el mamífero ha sido diagnosticado como paciente de severos LES, por ejemplo, mediante una o más de las medidas anteriores.

[0253] Un mamífero en riesgo de sufrir una recaída de lupus también puede mostrar uno o más de los síntomas

anteriores y ha sufrido previamente de síntomas de lupus. Alternativa o adicionalmente, se sabe que un mamífero en riesgo de sufrir una recaída de lupus ha sufrido previamente de lupus y está siendo tratado con terapia de estrógeno y/o un medicamento de sulfonamida y/o un interferón.

5 **[0254]** En un ejemplo, el sujeto sufre de síndrome de Sjorgen. Cada ejemplo descrito en el presente documento se tendrá que aplicar, *mutatis mutandis*, al tratamiento del síndrome de Sjörge.

10 **[0255]** El síndrome de Sjörge se puede diagnosticar (o un sujeto que sufre de síndrome de Sjörge se puede seleccionar) por la detección de autoanticuerpos (por ejemplo, anticuerpos antinucleares (por ejemplo, SSA/Ro y SSB/La), factor reumatoide, alfa-fodrin y/o anticuerpos anti-tiroides), la sequedad de los ojos, la inflamación de la glándula salival y/o anemia.

15 **[0256]** En un ejemplo, el síndrome de la Sjörge está asociado con lupus, es decir, se produce en un sujeto que padece de lupus.

[0257] En un ejemplo, el sujeto sufre de la esclerodermia. Cada ejemplo descrito en el presente documento se tendrá que aplicar *mutatis mutandis* para el tratamiento de la esclerodermia.

20 **[0258]** En un ejemplo, el scleroderma es la esclerodermia sistémica, tales como la esclerodermia sistémica limitada o esclerodermia sistémica difusa.

25 **[0259]** La esclerodermia puede diagnosticarse (o un sujeto que sufre de la esclerodermia puede seleccionarse) mediante la detección de autoanticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de anti-topoisomerasa (en una forma sistémica difusa de la esclerodermia), anticuerpos anti-centrómeros (en una forma sistémica limitada de la esclerodermia), anticuerpos anti-U3o anticuerpos de polimerasa de anti-ARN), signos locales o generalizados de inflamación de la piel (enrojecimiento, hinchazón, dolor, picazón y dolor) que pueden conducir a la firmeza de la piel o el endurecimiento de la piel, sobre todo en los dedos, pies, cara y cuello. Varios síntomas también pueden ocurrir en, por ejemplo, el sistema digestivo, los pulmones y los vasos sanguíneos.

30 **[0260]** En un ejemplo, la esclerodermia se asocia con lupus, es decir, se produce en un sujeto que padece lupus.

35 **[0261]** En un ejemplo, el mamífero es resistente a, no responde adecuadamente a, o no es adecuado para el tratamiento con otro compuesto usado para tratar la enfermedad o condición. Por ejemplo, el mamífero es resistente a, no responde adecuadamente a, o no es adecuado para el tratamiento con un corticosteroide y/o un inmunosupresor y/o un agente antipalúdico y/o azatioprina y/o ciclofosfamida y/o micofenolato de mofetilo y/o metotrexato y/o un anticuerpo anti-TNF y/o un anticuerpo anti-CD20 y/o un anticuerpo anti-IL6 y/o un anticuerpo anti-CD22.

40 **Composiciones**

45 **[0262]** De manera adecuada, en composiciones o métodos para la administración de la inmunoglobulina anti-IL-3R α a un mamífero, la inmunoglobulina se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o excipiente, como se entiende en la técnica. Por consiguiente, un ejemplo de la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina anti-IL-3R α combinada con un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o excipiente. En otro ejemplo, la divulgación proporciona un kit que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o excipiente adecuado para combinarse o mezclarse con la inmunoglobulina antes de la administración al mamífero. En este ejemplo, el kit puede comprender además instrucciones de uso.

50 **[0263]** En términos generales, por "vehículo, diluyente o excipiente" se entiende un relleno sólido o líquido, aglutinante, diluyente, encapsulación de sustancias, 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, una variedad de vehículos aceptables, diluyentes o excipientes, conocidos en la técnica puede utilizarse, como por ejemplo se describe en Remington Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. EE.UU., 1991).

60 **[0264]** A modo de ejemplo solamente, 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 incluidos aceites vegetales, aceites sintéticos y mono- o di-glicéridos sintéticos, alcoholes inferiores, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas con fosfato, lubricantes tales como estearato de sodio o de magnesio, 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 es 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, intra-arterial, intramuscular y subcutánea. También se contempla
65 la entrega de una formulación de depósito o de liberación lenta que puede suministrarse por vía intradérmica,

intramuscular y subcutánea, por ejemplo.

Terapias de combinación

5 **[0265]** En un ejemplo, la inmunoglobulina que se une a IL-3R α se administra en combinación con otro compuesto útil para tratar una enfermedad o afección, por ejemplo, lupus (tales como LES), ya sea como pasos de tratamiento combinados o adicionales o como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

10 **[0266]** Por ejemplo, el otro compuesto es un compuesto anti-inflamatorio. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un inmunosupresor. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un corticosteroide, como la prednisona y/o prednisolona. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un compuesto antimalárico, tales como hidroxicloroquina o cloroquina. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es metotrexato. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es azatioprina. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es ciclofosfamida. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, rituximab o ofatumumab). Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, epratuzumab). Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, infliximab o adalimumab o golimumab). Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un antagonista de CTLA-4 (por ejemplo, abatacept, CTLA4-Ig). Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es anticuerpo anti-IL-6. Alternativamente, o adicionalmente, el otro compuesto es un antagonista de BLYS, tal como un anticuerpo anti-BLYS (por ejemplo, belimumab).

Dosis y momentos de administración

25 **[0267]** Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección o la recaída de la misma, la dosis apropiada de un agente activo (es decir, una inmunoglobulina anti-IL-3R α), dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y curso de la enfermedad, de si se administra la inmunoglobulina con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la inmunoglobulina, y la discreción del médico tratante. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, el tiempo y la repetición, dependerá del individuo particular y el historial médico del individuo según lo evaluado por un médico. Típicamente, un médico administrará una inmunoglobulina hasta que se alcance una dosis que consiga el resultado deseado.

35 **[0268]** Los métodos de la presente descripción son útiles para tratar, mejorar o prevenir los síntomas de enfermedades o condiciones, tales como lupus (por ejemplo, LES) en un mamífero, o para mejorar el pronóstico de un mamífero. La calidad de vida en un mamífero que padece lupus puede mejorarse, y los síntomas de lupus pueden reducirse o eliminarse después del tratamiento con la inmunoglobulina. Los métodos de la presente divulgación también son útiles para retrasar el desarrollo de o la prevención de lupus en un individuo en riesgo de desarrollar lupus o una recaída del mismo.

40 **[0269]** Para la administración *in vivo* de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de un individuo o más por día. Dosis ejemplares y gamas de las mismas 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 se puede mantener hasta que se consiga una supresión deseada de los síntomas.

45 **[0270]** En algunos ejemplos, la inmunoglobulina se administra a una dosis inicial (o de carga) de entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, tal como de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o aproximadamente 2 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg o 4 mg/kg o 5 mg/kg. La inmunoglobulina se puede administrar a una dosis de mantenimiento de entre aproximadamente 0,0001/kg a aproximadamente 1 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,0005/kg a aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, tal como aproximadamente 0,2 mg/kg o 0,3 mg/kg o 0,4 mg/kg o 0,5 mg/kg. Las dosis de mantenimiento se pueden administrar cada 7-30 días, como por ejemplo, cada 10-15 días, por ejemplo, cada 10 o 11 o 12 o 13 o 14 o 15 días.

50 **[0271]** En algunos ejemplos, la inmunoglobulina se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,0001/kg a aproximadamente 50 mg/kg, tal como entre aproximadamente 0,0005/kg a aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg, por ejemplo, entre 0,005 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, tal como entre aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg. Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, tal como aproximadamente 0,2 mg/kg o 0,3 mg/kg o 0,4 mg/kg o 0,5 mg/kg (por ejemplo, sin una dosis de carga superior). En algunos ejemplos, numerosas dosis se administran, por ejemplo, cada 7-30 días, tales como, cada 10-22 días, por ejemplo, cada 10-15 días, por ejemplo, cada 10 o 11 o 12 o 13 o 14 o 15 o 16 o 17 o 18 o 19 o 20 o 21 o 22 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra cada 7 días o cada 14 días o cada 21 días.

[0272] En algunos ejemplos, la inmunoglobulina se administra a una dosis de entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, tal como de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o aproximadamente 2 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg o 4 mg/kg o 5 mg/kg, o tal como de aproximadamente 10 mg/kg a 30 mg/kg, tal como aproximadamente 10 mg/kg o 15 mg/kg o 20 mg/kg o 25 mg/kg (por ejemplo, sin una dosis de mantenimiento más baja). En algunos ejemplos, se administran dosis múltiples, por ejemplo, cada 10-70 días, como cada 14-70 días, como por ejemplo, cada 14-60 días, por ejemplo, cada 14-50 días, como cada 14-40 días, o cada 14-30 días. Por ejemplo, las dosis se administran cada 14 o 21 o 25 o 28 o 35 o 40 o 42 o 49 o 50 o 55 o 57 o 63 o 70 días. Por ejemplo, la inmunoglobulina se administra cada 21 días o cada 28 días o cada 35 días o cada 42 días o cada 49 días o cada 56 días.

[0273] En algunos ejemplos, en el momento de iniciar el tratamiento, se administra al mamífero la inmunoglobulina en no más de 7 días consecutivos o 6 días consecutivos o 5 días consecutivos o 4 días consecutivos.

[0274] En el caso de un mamífero que no responde adecuadamente al tratamiento, dosis múltiples se pueden administrar en una semana. Alternativamente, o además, dosis crecientes se pueden administrar.

[0275] En otro ejemplo, para los mamíferos que experimentan una reacción adversa, la dosis inicial (o de carga) se podrá dividir en numerosos días en una semana o durante numerosos días consecutivos.

[0276] Las dosis de una inmunoglobulina particular pueden determinarse empíricamente en los mamíferos que han recibido una o más administraciones de la inmunoglobulina. Para evaluar la eficacia de una inmunoglobulina, un síntoma clínico de una enfermedad o afección, por ejemplo, lupus (tales como LES) se puede controlar.

[0277] La administración de una inmunoglobulina de acuerdo con 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 puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, durante o después del desarrollo de lupus (tales como LES).

[0278] En un ejemplo, la inmunoglobulina se administra con el fin de lograr una reducción de una puntuación de evaluación de la gravedad de LES, por ejemplo, los criterios de BILAG y/o ECLAM y/o LAI y/o SIS y/o SLAM y/o SLEDAI. Por ejemplo, el tratamiento con la inmunoglobulina logra una reducción en uno o dos o tres puntos de acuerdo con la BILAG y/o SLEDAI. Por ejemplo, la reducción se consigue por 15 semanas después de comenzar la terapia o en 30 semanas después de comenzar la terapia o por 52 semanas después de comenzar la terapia. Por ejemplo, el efecto se mantiene durante aproximadamente 20 semanas o 30 semanas o 40 semanas o 50 semanas después de comenzar el tratamiento.

EJEMPLOS NO LIMITANTES

[0279] Las denominaciones de anticuerpos utilizados en los ejemplos son las siguientes: (i) un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-3R α (designado 7G3); (ii) una versión quimérica de 7G3 con un dominio constante de IgG1 humana (ch7G3 designado); (iii) una versión IgG1 humanizada de 7G3 (hz7G3 designado); (iv) una versión humanizada de 7G3 contiene Xencor V90, S239D/I332E, G1/G2 modificaciones Fc (hz7G3V1 designado); (v) una versión humanizada de 7G3 contiene Xencor V209, modificaciones Fc G1/G2 S239D/I332E/A330L (hz7G3V2 designado); y (vi) una versión afucosilada de hz7G3 producida utilizando una línea celular de CHO deficiente de fucosiltransferasa (hz7G3V3 designado).

EJEMPLO 1

Expresión de IL-3R α

[0280] Las PBMC se identificaron a partir de los seres humanos utilizando técnicas estándar y varios linajes de células aisladas utilizando anticuerpos que se unen a los marcadores de superficie celular específicos de linaje. Mediante el uso de perlas de Quantibrite™ (BD Biosciences), el número de moléculas IL-3R α por célula se determinó para cada linaje. Como se muestra en la Figura 1, IL-3R α se expresa altamente en pDC y basófilos y en niveles bajos en otros linajes celulares ensayados. Este patrón de expresión limitada hace que IL-3R α sea un objetivo útil para un anticuerpo diseñado para selectivamente eliminar pDC y basófilos.

EJEMPLO 2

Agotamiento anti-IL-3R α mAb de pDC humanos in vitro

[0281] Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante normal por separación Ficoll™ y se incubaron a 37°C durante diversos momentos en RPMI/10% FCS sin anticuerpo (sin anticuerpo), con

10 µg/ml anti-ch7G3 o con 10 µg/ml anti-hz7G3V3. 1x10⁶ células fueron cultivadas de forma rutinaria en un volumen de 200 µl en una placa de fondo en U de 96 pocillos. El análisis de números de células dendríticas plasmocitoides (pDC) y números de basófilos se determinaron mediante citometría de flujo (Tablas 1 y 2, respectivamente). pDC humanos se identificaron por citometría de flujo como el linaje marcador negativo (CD20⁻, CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻ CD56⁻), HLA-DR positivo, CD11c negativo e IL-3Rα positivo (véase el recuadro cerrado en los diagramas de flujo). Se identificaron basófilos humanos por citometría de flujo como marcador de linaje negativo (CD20⁻, CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻ CD56⁻), IgE positivo e IL-3Rα positivo. El anticuerpo anti-IL-3Rα que contiene modificaciones en el dominio Fc (hz7G3V3) pDC agotados y basófilos de PBMC tan pronto como 4 h después de la adición y se mantuvo pDC y el agotamiento de basófilos de hasta 48 h después de la adición. La adición de un anticuerpo anti-IL-3R sin función efectora mejorada (ch7G3) resultó en números pDC reducidos observados en 24 mano 48 h después de la adición. Sin embargo, el efecto observado era sustancialmente menor que el observado para hz7G3V3 y no agotó sustancialmente totalmente pDC por 48 horas.

Tabla 1: Porcentaje de pDC en cultivo celular tras el tratamiento de anticuerpos.

	PDC (% del total de células que quedan en el cultivo)		
	4h	24h	48h
Control (sin anticuerpo)	0,14	0,05	0,07
ch7G3	0,1	0,02	0.005
hz7G3V3	0,008	0	0

Tabla 2: Porcentaje de basófilos en cultivo celular tras el tratamiento de anticuerpos.

	Basófilos (% del total de células en cultivo restante)		
	4h	24h	48h
Control (sin anticuerpo)	0,66	1.08	1,94
hz7G3V3	0,25	0,07	0

EJEMPLO 3

Agotamiento anti-IL-3Rα in vivo de pDC y basófilos en primates no humanos

[0282] Un estudio de primate no humano cynomolgus no-GLP (NHP) se llevó a cabo en el Centro Nacional de Primates de Australia con arreglo a sus procedimientos operativos estándar. Todos los protocolos y modificaciones se aprobaron por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional. A Monos Naive se les administró una dosis única de la neutralización de anticuerpos anti-IL-3Rα con modificaciones en el dominio Fc que mejoraron la función efectora de anticuerpos (h z7G3V3) mediante infusión intravenosa. La sangre periférica se recogió en diversos puntos temporales y el análisis de basófilos NHP y pDC perfumados por citometría de flujo. Basófilos PHN se identificaron por citometría de flujo como IgE+/CD123 positivas. pDC se identificaron por citometría de flujo como el linaje marcador negativo (CD20⁻, CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻), HLA-DR positiva, CD11c negativa y IL-3Rα positiva.

[0283] La administración de hz7G3V3 dio lugar a una considerable reducción en el número de basófilos y pDC en la sangre periférica en todas las dosis, evidente tan pronto como 6 horas después de la administración de anticuerpos. Esta reducción se mantuvo durante más de 8 días antes del retorno dependiente de la dosis de ambos tipos de células, ya sea en día 11 (basófilos) o día 15 (pDC) (Figura 2). **[0284]** No se observó reducción significativa de cualquier otro tipo de célula probado (incluyendo neutrófilos, células T, células B, monocitos y células rojas de la sangre) para cualquier mono en cualquier dosis y no se observaron eventos adversos. Estos datos indican que hz7G3V3 agota selectivamente pDC y basófilos cuando se administra *in vivo* y que pDC y poblaciones de basófilos pueden recuperarse cuando hz7G3V3 se elimina del sistema.

EJEMPLO 4

Comparación in vitro de la actividad de ADCC de mAbs anti-IL-3Rα

[0285] pDC humanos y células NK se aislaron a partir de dos capas leucocitarias sanas utilizando kits de selección negativa como se detalla por el fabricante (Miltenyi Biotech). Las células NK (efectores "E" = 100.000 células) y pDC (objetivos "T" = 10.000 células), se incubaron conjuntamente en presencia de 10 µg/ml, de varias versiones de un

anticuerpo anti-IL-3R α (hz7G3V1, hz7G3V2 y hz7G3V3) a una relación E:T de 10:1 en un volumen final de 150 μ l en placas de fondo en U de 96 pocillos. La lisis autóloga (pDC1-NK1, pDC2-NK2) y la lisis alogénica (pDC1-NK2, pDC2-NK1) se examinaron después de 4 horas de incubación a 37°C en RP-MI/10% FCS. La lisis celular se midió utilizando un kit de citotoxicidad no radiactivo LDH CytoTox 96 (Promega).

5 **[0286]** La lisis específica se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Lisis Específica} = \frac{[\text{Lisis de Muestra} - \text{Lisis Espontánea}]}{[\text{Lisis Espontánea de Lisis Máxima}]} \times 100\%$$

10 **[0287]** La lisis máxima se evaluó mediante la adición de ExtranTM a una concentración final de 0,75% (v/v). La lisis espontánea era la que se produjo en los pocillos con células solas (sin Ab).

[0288] Niveles significativos de lisis pDC se observaron con mAbs anti-IL-3R α que se habían alterado para la capacidad de ADCC mejorada en comparación con el anticuerpo anti-IL-3R α hz7G3 (Figura 3).

15 EJEMPLO 5

Inhibición de la producción de interferones por mAbs anti-IL-3R α

20 **[0289]** Se aislaron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) de un donante normal y se incubaron a 37°C durante 18 h sin anticuerpo (0 μ g/ml), con dosis crecientes (1, 10 o 100 μ g/ml) del anticuerpo anti-IL-3R hz7G3 o anticuerpos anti-IL-3R que contienen modificaciones en el dominio Fc que mejora la función efectora del anticuerpo (hz7G3V3 y hz7G3V1). El oligonucleótido de CpG de tipo C (5 μ M) se añadió para activar las células dendríticas plasmacitoides. Se recogieron los sobrenadantes en cada 6 h o 24 h post-activación y se analizaron para la producción de IFN α por ELISA. Como se muestra en la Figura 4, la adición del anticuerpo hz7G3 resultó en una pequeña reducción de la producción IFN α , y este efecto no parecía estar afectado por el aumento de la dosis de anticuerpo. Por el contrario, la adición de anticuerpos anti-IL-3R que contienen modificaciones en el dominio Fc (hz7G3V3 y hz7G3V1) redujeron considerablemente la producción de IFN α a partir de PBMC en 6 h o 24 h post-activación en todas las dosis de anticuerpo.

30 **[0290]** En un estudio adicional, PBMC fueron aisladas de un donante normal y se incubaron a 37°C durante 18 h sin anticuerpo o con dosis crecientes de hz7G3V3 o anticuerpos de control de isotipo. El oligonucleótido de CpG de tipo C (5 μ M) se añadió para activar pDC. Los sobrenadantes se recogieron a 24h post-activación y se analizaron para producción IFN γ por ELISA. La adición de hz7G3V3 redujo considerablemente la producción de IFN α a partir de PBMC. El agotamiento *in vitro* de pDC por hz7G3V3 se correlaciona con la inhibición de la producción IFN α de PBMC tratada con el ligando TLR-7/9, CpG (Figura 5). La adición de CpG a PBMC induce la producción de IFN α de una manera similar a complejos inmunes de LES, que contienen componentes de la cromatina que son predominantemente agonistas TLR-7/9. Estos datos indican que hz7G3V3 puede eliminar de manera efectiva la fuente de IFN α inducida por agonistas TLR-7/9 en células sanguíneas periféricas. Los datos también indican que otros tipos de células sanguíneas periféricas que no son el objetivo de hz7G3V3 no pueden compensar la pérdida de pDC para la producción de IFN α en respuesta a la estimulación de TLR-7/9.

45 **[0291]** Se realizó un estudio adicional para determinar el efecto del agotamiento de células en niveles IFN α . Se aislaron PBMC a partir de un donante normal y se incubaron a 37°C durante 18 h sin anticuerpo (0 μ g/ml), con dosis crecientes de anticuerpos neutralizantes anti-IL-3R que contienen modificaciones en el dominio Fc que mejoró la función efectora de anticuerpos (hz7G3V3) o la región Fab del mismo anticuerpo (hz7G3 Fab). Oligonucleótido de CpG de tipo C (5 μ M) se añadió para activar pDC. Se recogieron los sobrenadantes en cada 6 h o 24 h post-activación y se ensayaron para la producción IFN α por ELISA. Como se muestra en la Figura 6, la adición de anti-IL-3R Fab neutralizantes (hz7G3 Fab) que carece de la función efectora no redujo la producción de IFN α , mientras que la adición de anticuerpos de anti-IL-3R que contienen modificaciones en el dominio Fc (hz7G3V3) completamente inhibieron la producción IFN α a partir de PBMC tanto a 6 h y 24 h post-activación.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 **[0292]**

<110> CSL Limited Vairo, Gino L Nash, Andrew Maraskovsky, Eugene Wilson, Nick Busfield, Samantha

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ORIENTACIÓN A CÉLULAS PRODUCTORAS DE INTERFERÓN DE TIPO I

60 <130> 510398

<160> 7

65 <170> Versión de Patentina 3,5

ES 2 618 562 T3

<210> 1
 <211> 359
 <212> PRT
 5 <213> homo sapiens

<400> 1

10

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly Ser Gln Ser
 145 150 155 160

65

ES 2 618 562 T3

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

ES 2 618 562 T3

5 <210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una VH de hz7G3
 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

45 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

50 <210> 3
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una VL de hz7G3
 <400> 3

60

65

ES 2 618 562 T3

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

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

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

35 Lys Arg

40 <210> 4
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de hz7G3

<400> 4

50

55

60

65

ES 2 618 562 T3

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

10
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

15
 Tyr Met Lys Trp Ala Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

20
 Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

25
 Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

30
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35
 Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

40
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

45
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

50
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

55
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

60
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

65
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

ES 2 618 562 T3

5																			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp			
	210						215					220							
10																			
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly			
	225					230					235					240			
15																			
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile			
					245					250					255				
20																			
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu			
				260					265					270					
25																			
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His			
			275					280					285						
30																			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg			
	290						295					300							
35																			
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys			
	305					310					315					320			
40																			
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu			
					325					330					335				
45																			
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr			
				340					345					350					
50																			
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu			
			355					360					365						
55																			
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp			
		370					375					380							
60																			
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val			
	385					390					395					400			
65																			
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp			
					405					410					415				
70																			
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His			
				420					425					430					
75																			
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro			
			435					440					445						
80																			
	Gly	Lys																	
		450																	

ES 2 618 562 T3

<210> 5
<211> 220
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de hz7G3

10

<400> 5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 618 562 T3

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

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

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

60 210 215 220

65 <210> 6
<211> 450
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 618 562 T3

5

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de hz7G3V1

5

<400> 6

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

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

ES 2 618 562 T3

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 5
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 10
 Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 15
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 20
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 25
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
 290 295 300
 30
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 35
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu
 325 330 335
 40
 Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 45
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 50
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 55
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
 385 390 395 400
 60
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 65
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

ES 2 618 562 T3

<210> 7
<211> 450
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de hz7G3V2

10

<400> 7

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 618 562 T3

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

10
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

15
 Tyr Met Lys Trp Ala Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

20
 Gly Asp Ile Ile Pro Ser Asn Gly Ala Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

25
 Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

30
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35
 Ala Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

40
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

45
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

50
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

55
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

60
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

65
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

70
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

ES 2 618 562 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 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

Reivindicaciones

- 5
1. Una inmunoglobulina que se une a una cadena de receptor α de interleucina 3 (IL-3R α) e inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3, como el producido por el 7G3 designado por hibridoma como se depositó en la ATCC con el número de acceso HB-12009, a IL-3R α y que reduce las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y basófilos al que se une para su uso en el tratamiento de lupus en un mamífero, en el que la inmunoglobulina no está conjugada con un compuesto tóxico que mata una célula a la que se une la inmunoglobulina y en la que la inmunoglobulina es capaz de inducir un mayor nivel de la función efectora, en la que la función efectora es:
- 10
- i. la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC);
 ii. la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o
 iii. la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
- 15
2. La inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 1, en la que el lupus es el lupus eritematoso sistémico (LES).
3. La inmunoglobulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cadena IL3R α se expresa por un pDC que produce uno o más interferones de tipo I y/o por un basófilo que produce una o más citoquinas.
- 20
4. La inmunoglobulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inmunoglobulina se une al mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 7G3 o un epítipo superpuesto.
5. La inmunoglobulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inmunoglobulina neutraliza la señalización de IL-3.
- 25
6. La inmunoglobulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inmunoglobulina es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 30
7. La inmunoglobulina para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el anticuerpo humanizado es un anticuerpo humanizado que comprende regiones determinantes de derivados de anticuerpo monoclonal 7G3, como se produce por el 7G3 designado por hibridoma como se depositó en la ATCC bajo el número de acceso HB-12009, por ejemplo, el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera de la región variable (V_L) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.
- 35
8. La inmunoglobulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la función efectora es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 40
9. La inmunoglobulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la que el nivel de la función efectora inducida por la inmunoglobulina se ha mejorado con relación a la de la inmunoglobulina cuando comprende una región Fc de IgG1 de tipo salvaje.
- 45
10. La inmunoglobulina para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la inmunoglobulina comprende una región Fc que está afucosilada o en la que la inmunoglobulina comprende una región Fc que comprende una o más sustituciones de secuencias de aminoácidos que mejoran la función efectora inducida por la inmunoglobulina.
- 50
11. La inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 10, en la que una o más sustituciones de secuencias de aminoácidos aumenta la afinidad de la región Fc de un receptor Fc γ (Fc γ R) en comparación con una porción Fc que no comprende las sustituciones, por ejemplo, las una o más sustituciones de secuencias de aminoácidos son:
- 55
- (i) S239D, A330L y I332E de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat; o
 (ii) S239D y I332E de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat.
- opcionalmente, cuando la inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en: hz7G3V1; y hz7G3V2.
- 60
12. La inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 1, en la que la siguiente administración de la inmunoglobulina, el número de células dendríticas plasmacitoides, (pDC) y basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente 50% en comparación con el número de los pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero antes de la administración de la inmunoglobulina, por ejemplo, al menos aproximadamente seis horas después de la administración de la inmunoglobulina, el número de pDC y basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente 50% en comparación con el número de los pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero antes de la
- 65

administración de la inmunoglobulina, por ejemplo, el número de pDC y basófilos en circulación en el mamífero se reduce en al menos aproximadamente 50% en comparación con el número de pDC y/o basófilos en circulación en el mamífero antes de la administración de la inmunoglobulina durante al menos 7 días después de la administración sin más administraciones de la inmunoglobulina.

5
13. La inmunoglobulina para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que se ha de administrar entre 0,001 mg/kg y 50 mg/kg de inmunoglobulina al mamífero.

10
14. La inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 1, en la que la inmunoglobulina se ha de administrar al mamífero una multitud de veces y en la que el período entre administraciones es de al menos 11 días.

15
15. El uso de una inmunoglobulina que se une a una cadena de receptor de la interleucina 3 (IL-3R α) e inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 7G3, como el producido por el 7G3 designado de hibridoma como se ha depositado en la ATCC bajo el número de acceso HB-12009, a IL-3R α y que reduce las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y basófilos a los que se une, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lupus en un mamífero, en el que la inmunoglobulina no está conjugado con un compuesto tóxico que mata una célula a la que la inmunoglobulina se liga y en el que la inmunoglobulina es capaz de inducir un nivel mejorado de la función efectora, en el que la función efectora es:

- 20
25
(i) la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC);
(ii) la fagocitosis dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCP) y/o
(iii) la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

30

35

40

45

50

55

60

65

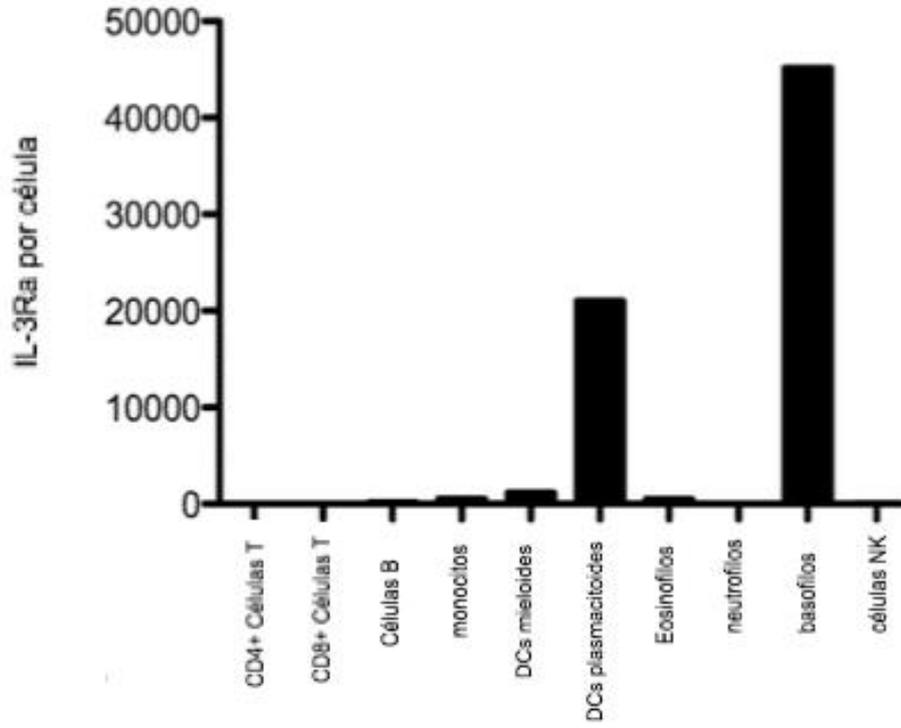


Figura 1

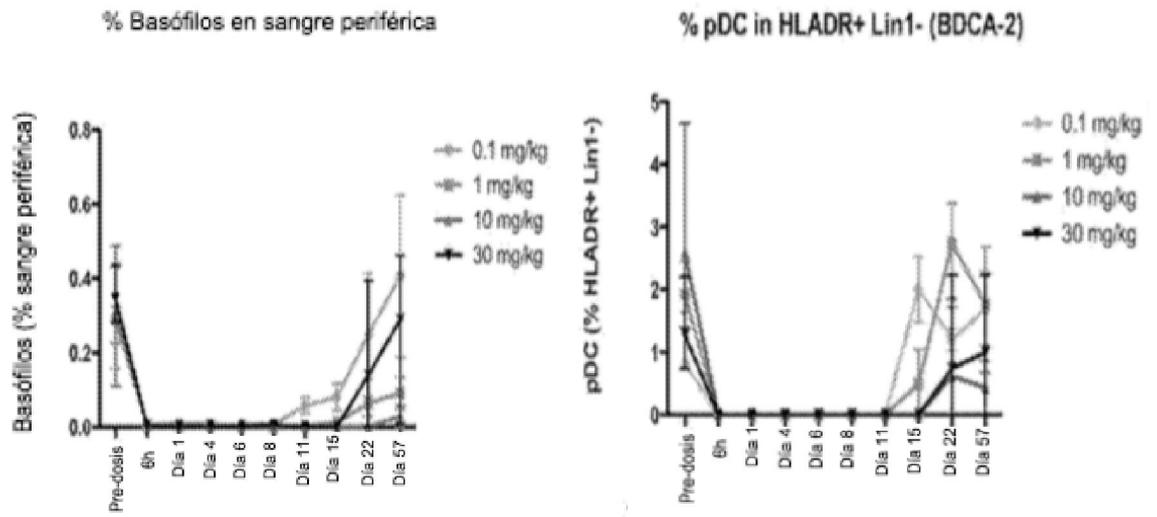


Figura 2

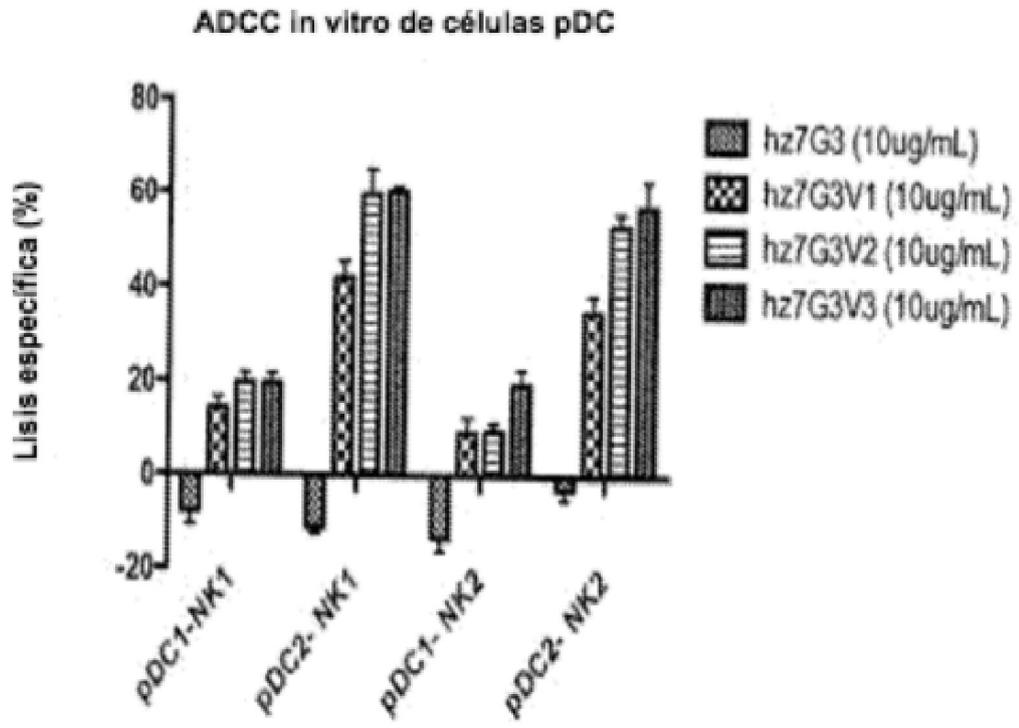


Figura 3

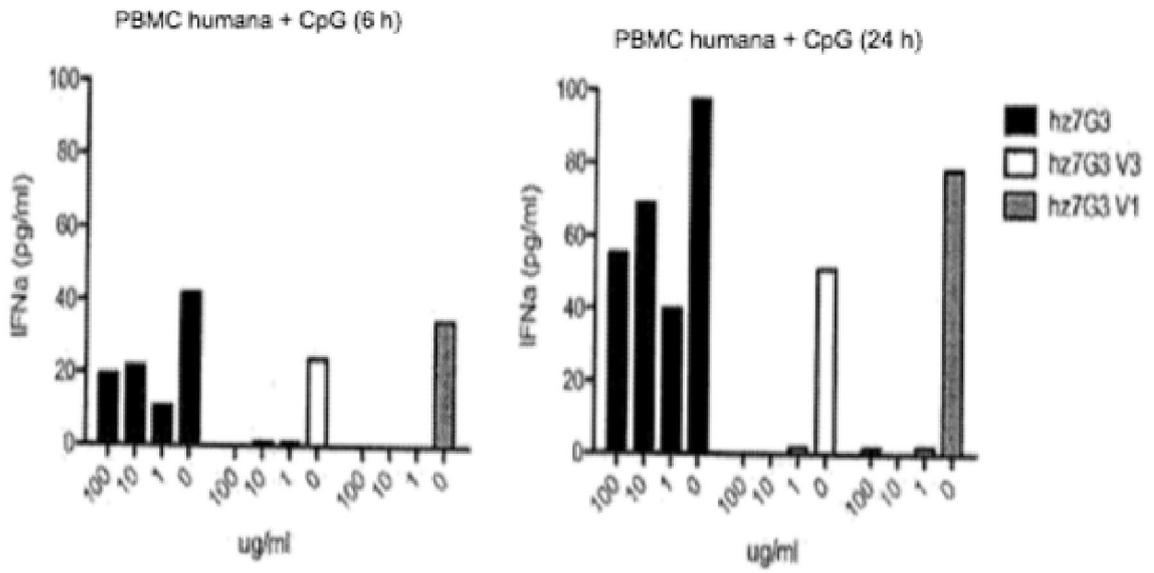


Figura 4

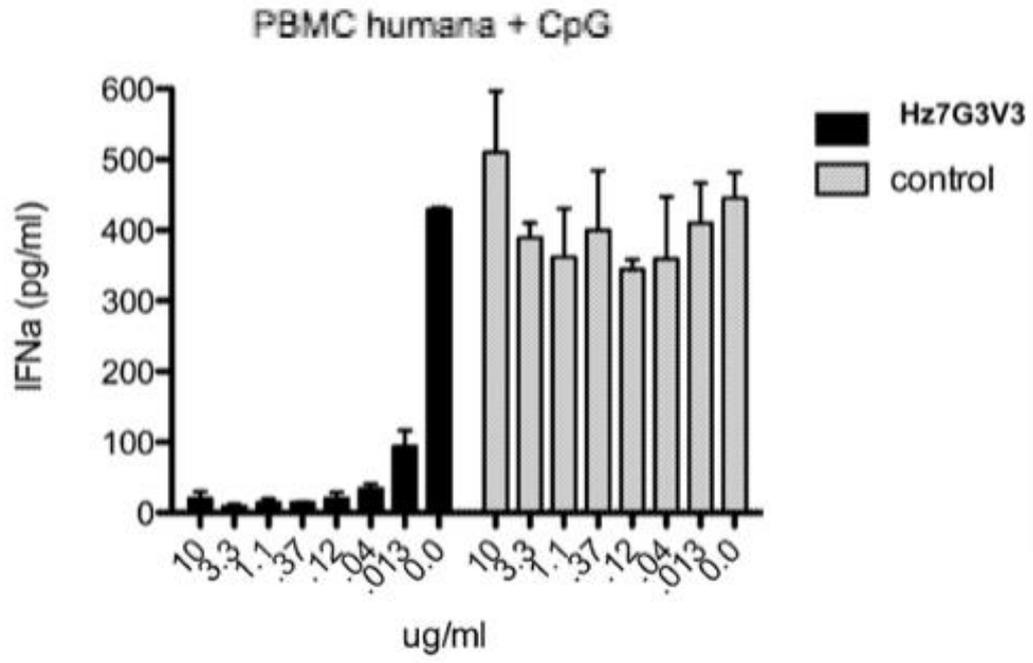


Figura 5

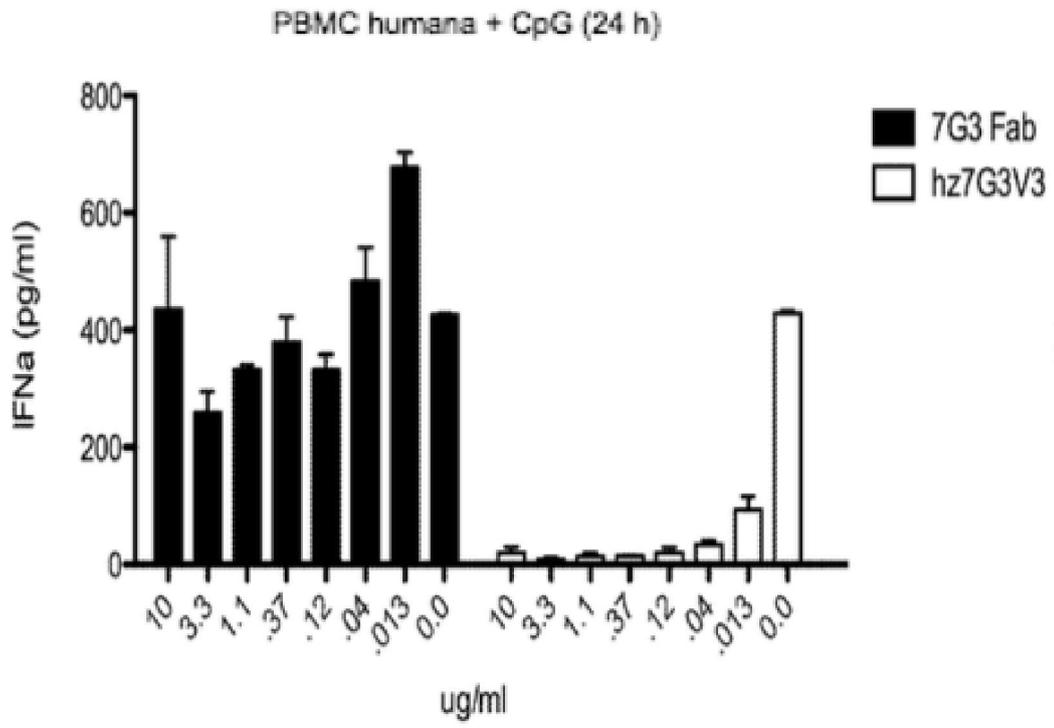


Figura 6