

ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA FLT3 Y SUS USOS

CAMPO

5 La presente invención se refiere a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen específicamente a tirosina quinasa tipo Fms 3 (FLT3). La invención se refiere además a anticuerpos heteromultímeros (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) que comprenden el anticuerpo FLT3 en una rama. También se proporcionan
10 composiciones que comprenden los anticuerpos FLT3, los métodos para producir y purificar dichos anticuerpos, y su uso en diagnóstico y terapéutica.

ANTECEDENTES

 Flt3 (también conocido como CD135, FLK3, STK1), un antígeno diana bien caracterizado para la leucemia mieloide aguda (AML), se sobreexpresa en los blastos
15 de pacientes con AML en comparación con las células sanas, y se expresa en la mayoría de las células del paciente (véase, por ejemplo, Carow *et al.*, Blood: 87(3) (Feb 1996); y Birg *et al.*, Blood: 80(10) (Nov 1992)). Además, Flt3 es el gen más frecuentemente mutado en pacientes con AML y las mutaciones que producen la activación constitutiva del receptor se asocian a un mal pronóstico (véase, por
20 ejemplo, Abu-Duhier *et al.* Br J Haematol., 111(1):190-5 (Oct 2000), Yamamoto *et al.*, Blood: 97 (8) (Abril de 2001)).

 La presencia de un conductor oncogénico en la superficie de blastos leucémicos proporciona una oportunidad para el desarrollo de una terapia dirigida. Los inhibidores de Flt3 de molécula pequeña han mostrado actividad en ensayos clínicos;
25 sin embargo, las respuestas usualmente son transitorias debido a la adquisición de resistencia. Además, los inhibidores de quinasa tratan solo a un porcentaje de pacientes que expresan la forma mutada de Flt3, lo que enfatiza la necesidad urgente de mejores terapias.

 También se ha desarrollado recientemente el anticuerpo biespecífico Flt3 en
30 forma de enfoque biespecífico que se acopla a células T, dado que Flt3 tiene una expresión relativamente baja en células tumorales en comparación con otros antígenos tumorales. Sin embargo, una limitación de muchos formatos biespecíficos es que son de bajo peso molecular y de vida media corta, por lo que requieren una infusión continua. Por consiguiente, aún existe la necesidad de anticuerpos (por
35 ejemplo, monoespecíficos o biespecíficos) que traten el cáncer tal como AML con perfil

de seguridad y eficacia mejorados, y adecuados para usar con pacientes humanos.

SÍNTESIS

La invención descrita en la presente se refiere a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos) que se unen específicamente a tirosina quinasa tipo Fms 3 (FLT3). En particular, los inventores de la presente invención han descubierto que los anticuerpos FLT3 de acuerdo con lo descrito en la presente en el formato biespecífico de longitud tiene una vida media más larga, una interacción Fc minimizada y una liberación de citoquina no específica minimizada *in vivo* a través de la interacción con las células inmunitarias. Además, los anticuerpos FLT3 dirigidos al dominio 4 de la proteína FLT3 de acuerdo con lo descrito en la presente en el formato biespecífico de longitud completa son más efectivos en la reducción de las células AML en comparación con otros dominios, incluidos los dominios 1, 2, 3 y 5 en el formato biespecífico indicado.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 246, o 247; (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 248, 249, 251, 252, 253, o 255; y iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 245, 250, o 254; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 257, 261, 263, 265, 268, 270, 273, o 275; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 259, 266, o 271; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 256, 258, 260, 262, 264, 267, 269, 272, o 274.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende: una región VH que

comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, o 233; y/o una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, o 232. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 229; y/o una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 228. En algunas formas de realización, la región VH descrita en la presente comprende una variante con una o varias sustituciones de aminoácidos conservadoras en los residuos que no están dentro de una CDR y/o la región VL descrita en la presente comprende una variante una o varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos que no están dentro de una CDR. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la región VH o VL puede comprender una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente o una variante de la misma con no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones conservadoras en residuos que no están dentro de una CDR.

En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:215, 229, o 231; y/o una región VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:214, 228, o 230. En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 229; y/o una región VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 228.

En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a FLT3 y compite con un anticuerpo aislado proporcionado en la presente que se une específicamente a FLT3.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana, y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula

efectora inmune humana, donde el primer dominio variable del anticuerpo se une al dominio 4 de FLT3 que comprende SEQ ID NO: 279 o dominio 5 de FLT3 que comprende la SEQ ID NO: 280.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, FLT3), y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector (por ejemplo, el Grupo de diferenciación 3 (CD3)) ubicado en la célula efectora inmune humana. En algunas formas de realización, el primer dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 15 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, o 233; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, o 232. En algunas formas de realización, el primer dominio variable del anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 246, o 247; (ii) una CDR2 25 VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 248, 249, 251, 252, 253, o 255; y iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 245, 250, o 254; y/o 30 (b) una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 257, 261, 263, 265, 268, 270, 273, o 275; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 35 187, 190, 193, 196, 259, 266, o 271; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia

mostrada en la SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 256, 258, 260, 262, 264, 267, 269, 272, o 274.

En algunas formas de realización, el segundo dominio variable del anticuerpo comprende la región VH y/o VL específica contra CD3. Por ejemplo, el segundo dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO:282; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende una CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 281.

En algunas formas de realización, el primer dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 229; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 228; y un segundo dominio variable del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO:282; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende a CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 281.

En algunas formas de realización, el segundo dominio variable del anticuerpo comprende (a) una región VH que comprende (i) una CDR1 VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 285, 286, o 287; (ii) una CDR2 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 288 o 289; y (iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 290; y/o una región VL que comprende (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 291; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 292; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 234.

En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente son de la subclase de IgG1, IgG2 o IgG2Δa, IgG3, o IgG4 humana. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante glicosilada. En algunas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente comprenden una región constante que tienen afinidad de unión disminuida a uno o más receptores gamma Fc humanos.

En algunas formas de realización, tanto el primer como el segundo dominio

variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden las modificaciones de aminoácidos en las posiciones 223, 225, y 228 (por ejemplo, (C223E o C223R), (E225R), y (P228E o P228R)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, K409R o L368E (esquema de numeración EU)) en la región CH3 de IgG2 humana (SEQ ID NO: 290).

En algunas formas de realización, tanto el primer como el segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en la posición 265 (por ejemplo, D265A) de la IgG2 humana.

En algunas formas de realización, tanto el primer como el segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 265 (por ejemplo, D265A), 330 (por ejemplo, A330S), y 331 (por ejemplo, P331S) de la IgG2 humana. En algunas formas de realización, tanto el primer como el segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico comprenden modificaciones de aminoácidos en cada una de las posiciones 265 (por ejemplo, D265A), 330 (por ejemplo, A330S), y 331 (por ejemplo, P331S) de la IgG2 humana.

En otras formas de realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

La invención también proporciona líneas celulares que producen en forma recombinante cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican una región variable de la cadena pesada y/o una región variable de la cadena liviana de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico o vector proporcionados en la presente. También se proporciona un método para producir un anticuerpo (por ejemplo, monoespecífico o biespecífico) proporcionado en la presente, que comprende cultivar una célula huésped proporcionada en la presente en condiciones que generan la producción del anticuerpo, y aislar el anticuerpo de la célula huésped o cultivo.

La invención también proporciona kits que comprenden una cantidad efectiva de cualquiera de los anticuerpos o conjugados de anticuerpo descritos en la presente.

También se proporciona un anticuerpo o anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente para usar como un medicamento.

La invención también proporciona métodos para tratar sujetos que lo necesitan

que comprenden proporcionar los anticuerpos aislados o anticuerpos biespecíficos descritos en la presente y administrar dichos anticuerpos a dicho sujeto.

También se proporcionan métodos para tratar una afección asociada con células malignas que expresan FLT3 en un sujeto que comprende administrar a un
5 sujeto que necesita una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos descritos en la presente. En algunas formas de realización, la afección es un cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer relacionado con FLT3 (por ejemplo, cualquier cáncer con la expresión de FLT3) seleccionado del grupo que consiste en mieloma múltiple, neoplasia maligna de
10 células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin predominante en linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma no Hodgkin de células B (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide
15 aguda crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma B-linfoblástico precursor, leucemia mieloide aguda, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma del tejido linfático asociado a la mucosa, linfoma linfocítica de células pequeñas, linfoma
20 de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes del mediastino primario (timo), linfoma linfoplasmaítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma primario, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico de células T/histiocitos,
25 linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma difuso cutáneo primario de células B grandes (tipo de pierna), linfoma difuso de células B grandes EBV positivo de edad avanzada, linfoma difuso de células B grandes asociado con inflamación, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes ALK positivo, linfoma plasmablastico, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de
30 Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico y otro cáncer relacionado con células hematopoyéticas.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición del

crecimiento o progresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan FLT3, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos o anticuerpos biespecíficos aislados, descritos en la presente.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de metástasis de células malignas que expresan FLT3 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición farmacéutica que comprende los anticuerpos o anticuerpos biespecíficos aislados, de acuerdo con lo descrito en la presente.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método de inducir regresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan FLT3, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos o anticuerpos biespecíficos aislados, de acuerdo con lo descrito en la presente.

15 En algunas formas de realización, los métodos de acuerdo con lo descrito en la presente además comprenden administrar una cantidad efectiva de un segundo agente terapéutico. En algunas formas de realización, el segundo agente terapéutico es un agente bioterapéutico, por ejemplo, un anticuerpo.

20 En algunas formas de realización, el segundo agente terapéutico es una citoquina, TNF α (Factor de necrosis tumoral alfa), un inhibidor de PAP (ácido fosfático fosfatasa), un virus oncolítico, un inhibidor de la quinasa, un inhibidor de la IDO (Indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa), un inhibidor de glutaminasa GLS1, una terapia CAR (Receptor de antígenos quiméricos) de células T o células T, un agonista TLR (por ejemplo, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9), o una vacuna anti-tumor. En algunas
25 formas de realización, la citoquina es IL-15 (Interleuquina-15).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS/DIBUJOS

La Figura 1 muestra que los anticuerpos biespecíficos FLT3/CD3 (la rama FLT3 es P5F7g, P5F7g1, P5F7g2, P5F7g3, o P5F7g4) inducen citotoxicidad en la línea celular AML Eo1.

30 La Figura 2 muestra que los anticuerpos biespecíficos FLT3/CD3 (la rama FLT3 es P1F1, P4A4, P4E5, o P5F7) con epítomos de unión al dominio 4 FLT3 son muy efectivos en la inducción de citotoxicidad en el modelo ortotópico Eo1.

La Figura 3 muestra que los anticuerpos biespecíficos FLT3/CD3 (la rama FLT3 es 6B7 o P8B6) dirigidos hacia el dominio 4 de la proteína FLT3 han mejorado
35 su eficacia tumoral en un xenoinjerto ortotópico en la presencia de células T humanas.

La Figura 4A y la Figura 4B demuestran valores de EC₅₀ disminuidos para el anticuerpo biespecífico FLT3/CD3 (P5F7) en ausencia o presencia de IL15, respectivamente.

Las Figuras 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, y 5F demuestran la destrucción de dos muestras primarias de AML en aspirados de médula ósea ex vivo inducidos por concentraciones crecientes de FLT3/CD3 biespecífico (P5F7) en presencia de células T autólogas. Se representa un aumento dependiente de la concentración en las células T totales y las células T activadas, según lo determinado por el porcentaje de células CD25+.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención descrita en la presente proporciona anticuerpos (por ejemplo, monoespecíficos o biespecíficos) que se unen específicamente a FLT3 (por ejemplo, FLT3 humano). La invención también proporciona polinucleótidos que codifican estos anticuerpos, composiciones que comprenden estos anticuerpos, y métodos para preparar y usar estos anticuerpos. La invención también proporciona métodos para tratar una afección asociada con patologías mediadas por FLT3 en un sujeto, tal como el cáncer. En particular, los inventores de la presente invención han descubierto que los anticuerpos FLT3 de acuerdo con lo descrito en la presente en el formato biespecífico de longitud completa tienen una vida media más larga, una interacción Fc minimizada y una liberación de citoquinas no específicas minimizada *in vivo* a través de la interacción con las células inmunes. Además, los anticuerpos FLT3 dirigidos al dominio 4 de la proteína FLT3 de acuerdo con lo descrito en la presente en el formato biespecífico de longitud completa son más efectivos en la reducción de las células AML en comparación con otros dominios, incluidos los dominios 1, 2, 3, y 5 en el formato biespecífico.

25

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, inmunología, virología, generación y manipulación genética de anticuerpos monoclonales, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican en su totalidad en la bibliografía, tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I.

30

35

Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Los anticuerpos (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

15 Definiciones

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, el término abarca no solo anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, sino también fragmentos de anticuerpos de los mismos (tales como, Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv), cadena simple (scFv), anticuerpos de dominio (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos de camélidos y tiburón), y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM, (o subclases de los mismos), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma, y mi, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término "fragmento de unión al antígeno" o "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, FLT3). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo se pueden realizar mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen Fab; Fab'; F(ab')₂; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una sola rama de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward *et al.*, Nature 341: 544-546, 1989), y una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Un anticuerpo o un polipéptido que "se une preferentemente" o "se une específicamente" (usado indistintamente en la presente) a una diana (por ejemplo, una proteína FLT3) es un término bien entendido en la técnica, y los métodos para determinar dicha unión específica o preferencial también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula exhibe "unión específica" o "unión preferencial" si reacciona o asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con una mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a un epítipo FLT3 es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con una duración mayor que la que se une a otros epítipos FLT3 o epítipos no FLT3. También se entiende que, mediante la lectura de esta definición, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específica o preferentemente a un primer objetivo puede no unirse específica o preferentemente a un segundo diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión preferencial.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena liviana del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación. Como se conoce en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y liviana consisten en cuatro regiones estructurales (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas

como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por la FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un método basado en la variabilidad de secuencia de cruzadas especies (es decir, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5.^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un método basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno–anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927–948)). Como se usa en la presente, una CDR se puede referir a las CDR definidas mediante cualquier enfoque o por una combinación de ambos enfoques.

Una "CDR" de un dominio variable son residuos de aminoácidos dentro de la región variable que se identifican de acuerdo con las definiciones de Kabat, Chothia, la acumulación de ambas definiciones Kabat y Chothia, AbM, contacto, y/o conformacionales o de cualquier método de determinación de CDR bien conocido en la técnica. Las CDR de anticuerpo se pueden identificar como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat *et al.* Véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, NIH, Washington DC Las posiciones de las CDR también se pueden identificar como las estructuras de bucle estructural descritas originalmente por Chothia y otros. Véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, *Nature* 342: 877-883, 1989. Otros enfoques para la identificación de CDR incluyen la "definición de AbM", que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva mediante el uso del software de modelado de anticuerpos ABM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®), o la "definición de contacto" de las CDR basadas en los contactos de antígenos observados, expuestos en MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745, 1996. En otro enfoque, denominado en la presente la "definición conformacional" de CDR, las posiciones de las CDR se pueden identificar como los residuos que hacen contribuciones entálpicas a la unión al antígeno. Véase, por ejemplo, Makabe *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166, 2008. Otras definiciones de límites CDR más pueden no seguir estrictamente uno de los enfoques anteriores, pero aun así se superpondrán con al menos una porción de las CDR de Rabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas a la luz de la predicción o los hallazgos experimentales de que residuos particulares o grupos de residuos o incluso CDR completas no tienen un impacto significativo sobre la unión al antígeno. Como se usa en la presente, una CDR se puede referir a CDR definidas por cualquier enfoque conocido en la técnica, que incluye combinaciones de enfoques. Los métodos

usados en la presente pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos enfoques. Para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR se pueden definir de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendidas, AbM, de contacto, y/o conformacionales.

5 Como se usa en la presente, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un
10 único sitio epitópico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de
15 anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, Nature 256: 495, 1975, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante tales como los descritos
20 en la patente U. S. N.º 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de bibliotecas de fagos generadas mediante el uso de, por ejemplo, las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-554, 1990.

 Como se usa en la presente, el término anticuerpo "humanizado" se refiere a las formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) que son cadenas
25 inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Con preferencia los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de la región determinante de
30 complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (anticuerpo donante)) tal como ratón, rata o conejo) que tienen la especificidad, afinidad, y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv (FR) de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes no humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede
35 comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR o

secuencias estructurales importadas refinar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente el total de al menos uno, y normalmente dos dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones de la CDR corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Se prefieren los anticuerpos que tienen regiones Fc modificadas de acuerdo con lo descrito en el documento WO 99/58572.

5 Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, o CDR H3) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

10

Como se usa en la presente, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha obtenido mediante el uso de cualquier técnica conocida para obtener anticuerpos conocidas en la materia o descritas en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena liviana humana. Un ejemplo de este tipo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena pesada humana y cadena liviana humana. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante el uso de diversas técnicas conocidas en la materia. En una forma de realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.*, Nature

15 Biotechnology, 14: 309 - 314, 1996; Sheets *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (Estados Unidos de América) 95: 6157 - 6162, 1998; Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381, 1991; Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581, 1991). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse mediante la inmunización de animales en los que los locus de inmunoglobulina humana se han introducido transgénicamente en lugar de los locus endógenos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las patentes U. S. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante la

20 25 30 35

inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B se pueden recuperar de un individuo o a partir de la

clonación de células individuales del ADNc, o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole *et al.* Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1):86-95, 1991; y la Patente U. S. N.º 5.750.373.

5 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos donde las secuencias de la región variable deriva de dos o más especies y las secuencias de la región constante deriva de otra especie, tal como un anticuerpo en que las secuencias de la región variable derivan de anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante derivan de un anticuerpo humano.

10 Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud. Por ejemplo, la cadena puede ser relativamente corta (por ejemplo, 10-100 aminoácidos), o más. La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados, y/o puede estar interrumpida por no aminoácidos. Los
15 términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcación. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más
20 análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos se pueden presentar como cadenas simples o cadenas asociadas.

Un "anticuerpo monovalente" comprende un sitio de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG o Fab). En algunos casos, un anticuerpo monovalente
25 puede tener más de un sitio de unión a antígeno, pero los sitios de unión son de diferentes antígenos.

Un "anticuerpo monoespecífico" comprende dos sitios de unión al antígeno idéntico por molécula (por ejemplo, IgG) de manera que los dos sitios de unión se unan al epítipo idéntico en el antígeno. Por lo tanto, compiten entre sí por la unión a
30 una molécula de antígeno. La mayoría de los anticuerpos encontrados en la naturaleza son monoespecíficos. En algunos casos, un anticuerpo monoespecífico también puede ser un anticuerpo monovalente (por ejemplo, Fab).

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión al antígeno por molécula (por ejemplo, IgG). En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las
35 mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden

ser biespecíficos.

Un anticuerpo "biespecífico" o "de doble especificidad" es un anticuerpo híbrido que tiene dos sitios de unión al antígeno diferentes. Los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo biespecífico se unen a dos epítomos diferentes, que pueden residir en
5 los mismos o diferentes dianas de proteína.

Un anticuerpo "bifuncional" es un anticuerpo que tiene sitios de unión al antígeno idéntico (es decir, secuencias de aminoácidos idénticas) en las dos ramas, pero cada sitio de unión puede reconocer dos antígenos diferentes.

Un "heteromultímero", "complejo heteromultimérico" o "polipéptido
10 heteromultimérico" es una molécula que comprende al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un residuo de aminoácido. El heteromultímero puede comprender un "heterodímero" formado por el primer y el segundo polipéptido o puede formar estructuras terciarias de orden superior en las que
15 están presentes polipéptidos además del primer y el segundo polipéptido.

Un "heterodímero", "proteína heterodimérica", "complejo heterodímero", o "polipéptido heteromultimérico" es una molécula que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, donde el segundo polipéptido difiere en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido en al menos un. residuo de aminoácido.

20 La "región de bisagra", "secuencia de bisagra", y variaciones de las mismas, como se usa en la presente, incluye el significado conocido en la técnica, que se ilustra en, por ejemplo, Janeway *et al.*, *Immunobiology: the immune system in health y disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4.^a ed., 1999); Bloom *et al.*, *Protein Science* (1997), 6:407-415; Humphreys *et al.*, *J. Immunol. Methods* (1997), 209:193-202.

25 La "región de bisagra tipo inmunoglobulina", "secuencia de bisagra tipo inmunoglobulina" y variaciones de las mismas, como se usa en la presente, se refieren a la región bisagra y a la secuencia bisagra de una molécula tipo inmunoglobulina o molécula tipo anticuerpo (por ejemplo, inmunoadhesinas). En algunas formas de realización, la región bisagra tipo inmunoglobulina puede derivarse de cualquier
30 subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o de IgA, IgE, IgD o IgM, que incluye sus formas quiméricas, por ejemplo, una región bisagra IgG1/2 quimérica.

La expresión "célula efectora inmune" o "célula efectora", como se usa en la presente, se refiere a una célula dentro del repertorio natural de células en el sistema inmune humano que se puede activar para afectar la viabilidad de una célula diana. La
35 viabilidad de una célula diana puede incluir la supervivencia, proliferación y/o

capacidad celular para interactuar con otras células.

Los anticuerpos de la invención se pueden producir mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de despliegue en fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de tales tecnologías u otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica (véase, por
5 ejemplo, Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45: 1628-50, 1999 y Fellouse, F.A., et al, J. Mol. Biol., 373(4):924-40, 2007).

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en una cadena mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, se puede impartir modificación
10 a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por medio de componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido también se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante la conjugación con un componente de marcación. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuza", la
15 sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con modificaciones internucleotídicas análogas tales como, por ejemplo, aquellos con uniones no cargadas (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con
20 intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, aquellos con uniones modificadas. (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo ordinariamente presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos
25 fosfato, protegidos por grupos protectores estándares, o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar con soportes sólidos. El OH terminal 5 'y 3' se puede fosforilar o sustituir con restos de grupo de
30 protección de aminas u orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden

derivatizar otros hidroxilos a grupos protectores estándares. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, incluidos, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro-o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixótidas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosas, sedoheptulosas, análogos de nucleósidos acíclicos y análogos básicos tales como ribósido de metilo. Una o más uniones fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero sin limitación, formas de realización en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)O', CO o CH₂ ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o sustituido o alquilo no sustituido (1-20 C) que contiene opcionalmente una unión éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente, que incluyen ARN y ADN.

Como se conoce en la técnica, una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena liviana de anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación.

Como se usa en la presente, "sustancialmente puro" se refiere a material que es al menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), con más preferencia, al menos 90% puro, con más preferencia, al menos 95% puro, aún con más preferencia, al menos 98% puro, y con máxima preferencia al menos 99% puro.

Una "célula huésped" incluye una célula o cultivo de célula individual que puede ser o ha sido un receptor de vectores para la incorporación de insertos de polinucleótido. Las células huésped incluyen la progenie de una célula huésped única, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN genómico) a la célula progenitora original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un polinucleótido de esta invención.

Como se conoce en la técnica, el término "región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una variante de la región Fc. Si bien los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para extender un residuo

de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo del mismo. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice UE como en Kabat. Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una

5 inmunoglobulina generalmente comprende dos regiones constantes, CH2 y CH3.

Como se usa en la técnica, "receptor Fc" y "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que incluyen

10 variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen una secuencia de aminoácidos similar que difiere principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. Los FcR se revisan en Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92, 1991; Capel *et al.*, Immunomethods, 4:25-34,

15 1994; y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41, 1995. Un "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto. (Guyer *et al.*, J. Immunol., 117:587, 1976; y Kim *et al.*, J. Immunol., 24:249, 1994).

El término "competir", como se usa en la presente con respecto a un

20 anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno (una porción) del mismo, se une a un epítipo de una manera suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo cognado disminuya en forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación

25 con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también se puede disminuir en forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede, pero no es necesario que sea el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer

30 anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe en forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando cognado, ya sea al mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos "compiten en forma cruzada" entre sí por la unión de sus respectivos epítopos. Ambos anticuerpos de competición y competición cruzada están abarcados por la presente invención.

35 Independientemente del mecanismo por el que se produce dicha competición o

competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional, o unión a un epítipo común, o porción del mismo), el experto en la materia puede apreciar, sobre la base de las enseñanzas proporcionadas en la presente, que tales anticuerpos competidores y/o de competición cruzada están abarcados y pueden ser
5 útiles para los métodos descritos en la presente.

Una "región Fc funcional" posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad
10 mediada por células dependiente de anticuerpo; fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, un receptor de células B), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo) y se puede evaluar mediante el uso de diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

15 Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, pero retiene al menos una función efectora de la región Fc de la
20 secuencia nativa. En algunas formas de realización, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y con preferencia, de aproximadamente de una a aproximadamente cinco sustituciones de
25 aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante de la presente poseerá con preferencia al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original, y con máxima preferencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con la misma, con más
30 preferencia, a al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con el mismo.

La expresión "función efectora" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de
35 anticuerpos incluyen, pero sin limitación, citotoxicidad mediada por células

dependiente de anticuerpos (ADCC), unión al receptor Fc, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fagocitosis, unión C1q y regulación por disminución de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR). Véase, por ejemplo, la patente U. S. N.º 6.737.056. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable del anticuerpo) y se puede evaluar mediante el uso de diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpo. Una medición ilustrativa de la función efectora es a través de la unión a Fcγ3 y/o C1q.

Como se usa en la presente, "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causar la lisis de la célula diana. La actividad de ADCC de una molécula de interés se puede evaluar mediante el uso de un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente U. S. N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células NK. Alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes *et al.*, 1998, PNAS (Estados Unidos de América), 95: 652-656.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una diana en presencia de complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, de acuerdo con lo descrito en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996).

Como se usa en la presente, el "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente: reducir la proliferación de (o destruir) células neoplásicas o cancerosas, inhibir la metástasis de células neoplásicas, reducir o disminuir el tamaño de FLT3 que expresa tumor, la remisión de una enfermedad asociada a FLT3 (por ejemplo, cáncer), disminuir los síntomas resultantes de una enfermedad asociada a FLT3 (por ejemplo, cáncer), aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen una enfermedad

asociada a FLT3 (por ejemplo, cáncer), disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar una enfermedad asociada a FLT3 (por ejemplo, cáncer), retrasar la progresión de una enfermedad asociada a FLT3 (por ejemplo, cáncer), curar una enfermedad asociada a FLT3 (por ejemplo, cáncer), y/o prolongar la supervivencia de los pacientes que tienen una enfermedad asociada a FLT3 (por ejemplo, cáncer).

"Mejoría" significa una disminución o mejora de uno o más síntomas en comparación con la no administración de un anticuerpo FLT3 (monoespecífico o biespecífico). "Mejoría" también incluye acortamiento o reducción en la duración de un síntoma.

Como se usa en la presente, una "dosis efectiva" o "cantidad efectiva" de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar cualquiera de uno o más resultados beneficiosos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos y de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la reducción de la incidencia o la mejoría de uno o más síntomas de diversas enfermedades o afecciones asociadas a FLT3 (tal como, por ejemplo, mieloma múltiple), disminuir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otro medicamento y/o, retrasar la progresión de la enfermedad asociada a FLT3 de los pacientes. Se puede administrar una dosis efectiva en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una dosis efectiva de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para llevar a cabo el tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosis efectiva de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica no se puede lograr junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "dosis efectiva" se puede considerar en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, se puede considerar que un único agente se administra en una cantidad efectiva si, junto con uno o más agentes adicionales, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, con más preferencia, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, pero no se limitan a, primates, caballos,

perros, gatos, ratones y ratas.

Como se usa en la presente, "vector" significa un constructo, que es capaz de suministrar, y con preferencia, expresar uno o más genes de secuencia de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores
5 virales, ADN desnudo o vectores de expresión de ARN, plásmido, cósmido o vector de fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión ADN o ARN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

Como se usa en la presente, "secuencia de control de la expresión" significa
10 una secuencia ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico para transcribir.

Como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" o
15 "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el ingrediente retenga actividad biológica y no sea reactivo con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándares tales como una solución salina regulada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión
20 aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para administración por aerosol o parenteral son solución salina regulada con fosfato (PBS) o solución salina normal (0,9%). Las composiciones que comprenden tales portadores se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing
25 Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science y Practice). of Pharmacy 21.^a Ed. Mack Publishing, 2005).

El término "marca que contiene glutamina del donante de acilo" o "marca de glutamina" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido o una proteína que contiene uno o más residuos de Gln que actúa como aceptor de amina de
30 transglutaminasa. Véase, por ejemplo, WO2012059882 y WO2015015448.

El término " k_{on} " o " k_a ", como se usa en la presente, se refiere a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las constantes de tasa (k_{on}/k_a y k_{off}/k_d) y las constantes de disociación de equilibrio se miden mediante el uso de anticuerpo entero (es decir, bivalentes) y proteínas FLT3
35 monoméricas (por ejemplo, una proteína de fusión FLT3 marcada con histidina).

El término " k_{off} " o " k_d ", como se usa en la presente, se refiere a la constante de tasa para disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", como se usa en la presente, se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una interacción de anticuerpo-antígeno.

5 La referencia a "aproximadamente" un valor del parámetro en la presente incluye (y describe) formas de realización que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. En general, el término "aproximadamente" se refiere al valor indicado de la
10 variable y a todos los valores de la variable que está dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95% para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, cualquiera que sea mayor. Cuando el término "aproximadamente" se usa dentro del contexto de un período de tiempo (años, meses, semanas, días, etc.), el término "aproximadamente" significa el período de
15 tiempo más o menos una cantidad del siguiente período de tiempo subordinado (por ejemplo, aproximadamente 1 año significa 11-13 meses, aproximadamente 6 meses significa 6 meses más o menos 1 semana, aproximadamente 1 semana significa 6-8 días, etc.), o dentro del 10 por ciento del valor indicado, el que sea mayor.

Se entiende que siempre que las formas de realización se describan en la
20 presente con la frase "que comprende", de otra manera se proporcionan también formas de realización análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

Cuando los aspectos o las formas de realización de la invención se describen en términos de un grupo Markush o de otro agrupamiento de alternativas, la presente
25 invención abarca no solo al grupo entero enumerado como un todo, sino a cada miembro del grupo individualmente y a todos los posibles subgrupos del grupo principal, sino también el grupo principal ausente uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también contempla la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, que incluye las definiciones. A lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones
35 tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero

o grupo de números enteros declarado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de número entero. A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

Los ejemplos de métodos y materiales se describen en la presente, aunque los
5 métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente también se pueden usar en la práctica o la prueba de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Anticuerpos FLT3 y métodos de obtenerlos

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a FLT3 [por
10 ejemplo, FLT3 humano (por ejemplo, número de acceso: NP_004110 o SEQ ID NO: 235)] y caracterizado por una o más de las siguientes características: (a) tratar, prevenir, mejorar uno o más síntomas de una afección asociada con células malignas que expresan FLT3 en un sujeto (por ejemplo, cáncer tal como AML); (b) inhibir el crecimiento o la progresión del tumor en un sujeto (que tiene un tumor maligno que
15 expresa FLT3); (c) inhibir la metástasis de células cancerosas (malignas) que expresan FLT3 en un sujeto (que tiene una o más células malignas que expresan FLT3); (d) inducir regresión (por ejemplo, regresión a largo plazo) de un tumor que expresa FLT3; (e) ejercer actividad citotóxica en células malignas que expresan FLT3; (f) bloquear la interacción FLT3 con otros factores aún por identificar; y/o (g) inducir un
20 efecto de activación inespecífica que mata o inhibe el crecimiento de células malignas que expresan FLT3 en los alrededores.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de
25 complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencias mostrada en la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 246, o 247; (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 40, 41, 46,
30 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 248, 249, 251, 252, 253, o 255; y iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 245, 250, o 254; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL
35 que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156,

159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 257, 261, 263, 265, 268, 270, 273, o 275; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 259, 266, o 271; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 256, 258, 260, 262, 264, 267, 269, 272, o 274.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3, donde el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, o 233; y/o una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, o 232. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende: una región VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO. 229; y/o una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 228.

En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo que tiene cualquiera de una secuencia de cadena liviana parcial como se enumera en la Tabla 1 y/o cualquiera de secuencia de cadena pesada parcial como se enumera en la Tabla 1. En la Tabla 1, las secuencias subrayadas son secuencias CDR de acuerdo con Kabat y en negrita de acuerdo con Chothia, excepto las secuencias de cadena pesada CDR2 de P4F6, P4C7, P3A1, P5A3, P9B5, P9E1, P1B4, P1B11, P7H3, P3E10, P1A5, P5F7, P4H11, P15F7, P12B6, P8B6, P14G2, y P7F9, la secuencia de CDR Chothia está subrayada y la secuencia CDR de Kabat está en negrita.

Tabla 1

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
P4F6	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC RAS HSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY G ASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFLTIS RLEPEDFAVYYC QQYGSPPRT FGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKAS GGTFGSY GISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGT VTYAQKFQGRVTITADEST RTAYMELSSLRSEDTAVYYCARD DSW SGATGASD TWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2)
P4C7	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC RAS QYVSASLLA WYQQKPGQAPRLLIY G	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKAS GGTFSSY TISWVRQAPGQGLEWMG

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
	<u>ASTRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QOYARSST</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 3)	<u>GIIPAFGI</u> ANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSED TAVYYCAK <u>GGS</u> <u>YSLDYFDI</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 4)
P3A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RAS</u> <u>QSISSYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>AAS</u> <u>SLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYC <u>QQSYSTPLT</u> FGQGTK VEIK (SEQ ID NO: 5)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KAS <u>GGTFSSY</u> DISWVRQAPGQGLEWMG <u>GIIPVSGR</u> ANYAQKFQGRVTITTDKS TSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR <u>VR</u> <u>PTYWPLDY</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 6)
P5A3	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT <u>TGTS</u> <u>SDVGGYNYVS</u> WYQQHPGKAPKLMI Y <u>EVSKRPS</u> GV PDRFSGSGSGNTASL TVSGLQAED EADYYC <u>SSYAGSNTVV</u> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 7)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KAS <u>GGTFSSY</u> YIGWVRQAPGQGLEWMG <u>GIIPWFGT</u> ANYAQKFQGRVTITADKS TNTAYMELSSLRSED TAVYYCA <u>ADH</u> <u>HDSPSGYTSGGFDV</u> WGQGT LTVS S (SEQ ID NO: 8)
P9B5	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC <u>SGS</u> <u>SSNIGSNYVY</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>R</u> <u>NNQRPS</u> GV PDRFSGSGSGTSASLAI SGLRSEDEADYYC <u>AAWDDSLSGVV</u> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 9)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFIFASYAM</u> SWVRQAPGKGLEWVSE <u>ISSGGSTTY</u> ADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR <u>DRV</u> <u>MAGLGYPFDY</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 10)
P9F1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC <u>SGS</u> <u>GSNIGSNYVY</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>R</u> <u>NNQRPS</u> GV PDRFSGSGSGTSASLAI SGLRSEDEADYYC <u>AAWDGSLSRPV</u> FGTGTKLTVL (SEQ ID NO: 11)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFIFSSFAM</u> SWVRQAPGKGLEWVSD <u>ISGSGASTYY</u> ADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAED TAVYYCAS <u>ASG</u> <u>GSGSYWPYMDP</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 12)
P1B4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QSVPNQLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>D</u> <u>ASSRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QOYGSPLT</u> FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 13)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KAS <u>GGVFSRYALS</u> WVRQAPGQGLEWMG <u>GIIPMLGF</u> ANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCAT <u>LDE</u> <u>GALDY</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 14)
P1B11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QSVSSSELA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>D</u> <u>ASSRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KAS <u>GGTFRSFDI</u> SWVRQAPGQGLEWMG <u>RIIPILGY</u> ANYAQKFQGRVTITADEST

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
	RLEPEDFAVYYC <u>QOYDSSPLT</u> FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 15)	STAYMELSSLRSED TAVYYC <u>ASDLG</u> <u>APWAGYPFDP</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16)
P7H3	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITC <u>GGN</u> <u>NIGSKSVH</u> WYQQKPGQAPVLVIYYD <u>SDRPS</u> GIPERFSGSNSGNTATLTISR VEAGDEADYYC <u>QVWDSSTAWV</u> FGG GTKLTVL (SEQ ID NO: 17)	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAAS <u>GFTFSSYAMH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>AISGSGGSTYYADSVKGR</u> FTISR DNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARGT</u> <u>RWWWGDAFDH</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)
P3E10	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SC <u>RAS</u> <u>QSVPSQLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYD <u>ASSRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPLT</u> FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 19)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KAS <u>GGTFSSYAIQ</u> WVRQAPGQGLEWMG <u>GIVGSWGL</u> ANYA QKFQGRVTITTDK STSTAYMELSSLRSED TAVYYCAT <u>SA</u> <u>FGELAS</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 20)
P1A5	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SC <u>RAS</u> <u>QAVDSSDLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYD <u>AYTRPS</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPLT</u> FGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 21)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KAS <u>GGVFSRYAL</u> SWVRQAPGQGLEWMG <u>GIIPMLGF</u> ANYA QKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCAT <u>LDF</u> <u>GALDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 22)
P5F7	EIVLTQSPATL SLSPGERATL SC <u>RAS</u> <u>QSVSSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYD <u>FTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC <u>QOYGSSPPT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISR DNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARDL</u> <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
P4H11	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SC <u>RAS</u> <u>QSVSNTYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIYD <u>TSSRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QOYGSSLT</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 25)	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISR DNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARDL</u> <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 26)
P15F7	DIQMTQSPSSL SASVGDRTITC <u>RAS</u> <u>QSISTYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>AAS</u> <u>NLQS</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYC <u>QOSYSIPLT</u> FGQG TK	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAAS <u>GFTFNMYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>VISGSGGT</u> TYADSVKGRFTISR DNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ASGI</u>

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
	VEIK (SEQ ID NO: 27)	<u>WDLRY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 28)
P12B6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QIVSSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>G</u> <u>ASSRAS</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QQYGGSPYT</u> FGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 29)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFMSY</u> AIWVRQAPGQGLEWMG <u>GIPIFGIANYA</u> QKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARE <u>ETLIY</u> <u>PIPFEL</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 30)
P8B6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QSVSHSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>G</u> <u>ASFRAA</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QQYGSDPYT</u> FGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 31)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSSY</u> AVSWVRQAPGQGLEWMG <u>GIPIFGIANYA</u> QKFQGRVTITADTSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAIE <u>GIGG</u> <u>DLRYDGYDA</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 32)
P14G2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RAS</u> <u>QSISSYLN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>DAS</u> <u>DLQR</u> GVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYC <u>QQSYNTPWT</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 33)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSNYVMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>AISGSGATTYY</u> ADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV <u>SGL</u> <u>WAGGI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 34)
P7F9	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC <u>TRSS</u> <u>GSIASNYVQ</u> WYQQKPGQAPVLVY <u>DDSDRPS</u> GIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYC <u>QVWDSSSDHWV</u> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 35)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMS</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>AIGGSGGSTYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARD <u>YYAFSDPAYGGMDV</u> WGQGLTVTVS S (SEQ ID NO: 36)
P08B06 EE	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QSVSHSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>G</u> <u>ASFRAA</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QQYGSEPYT</u> FGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 204)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSSY</u> AVSWVRQAPGQGLEWMG <u>GIPIFGIANYA</u> QKFQGRVTITADTSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAIE <u>GIGG</u> <u>DLRYEGYDA</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 205)
P04A04	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QSVTSSQLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>D</u> <u>ASSRAT</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSLLIT</u> FGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 206)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSSY</u> YITWVRQAPGQGLEWMG <u>RIMPAFGWTN</u> YAQKFQGRVTITTDK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS <u>DE</u> <u>FGAFDV</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
		NO: 207)
P01A05	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RA</u> <u>QAVDSSDL</u> AWYQHKPGQAPRLLIY <u>D</u> <u>AYTRPS</u> GIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPLT</u> FGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 208)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGVFSRYAL</u> SWVRQAPGQGLEWMG <u>GIIPMLGF</u> FANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED ~~AVYYCAT~~ <u>LDE</u> <u>GALDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 209)
P08B03	DIVMTQSPGTLSPGERATLSC <u>RA</u> <u>SQSVSSNL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>D</u> <u>AYTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYC <u>QQYGSPYT</u> FGQGT KVEIK (SEQ ID NO: 210)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTFSSYDI</u> SWVRQAPGQGLEWMG <u>RIIPSFGA</u> ANYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSED ~~AVYYCAT~~ <u>DDG</u> <u>EGWTPPFGY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 211)
P5F7	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RA</u> <u>QSVSSNL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DT</u> <u>FTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPPT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 212)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN KNTLYLQMNSLRAED ~~AVYYCARD~~ <u>DL</u> <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 213)
P5F7g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RA</u> <u>QSVSSNL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DT</u> <u>FTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTIS LEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPPT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 214)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN KNTLYLQMNSLRAED ~~AVYYCARD~~ <u>DL</u> <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 215)
P10A02 g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RA</u> <u>QDVSDLL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>YTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTIS LEPEDFAVYYC <u>QQYASSPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 216)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN KNTLYLQMNSLRAED ~~AVYYCARD~~ <u>DL</u> <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 217)
P10A04 g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RA</u> <u>QKVSDLL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>YTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
	LEPEDFAVYYC <u>QQYTGSPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 218)	KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDL <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 219)
P10A05 g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>CRAS</u> <u>LSVSDLLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>YSRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC <u>QQYSSNPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 220)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGRFTISRDN</u> S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDL <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 221)
P10A07 g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>CRAS</u> <u>GSVSDLLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>YSRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC <u>QQYASYPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 222)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGRFTISRDN</u> S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDL <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 223)
P10B03 g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>CRAS</u> <u>QSVSDLLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>FSRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC <u>QQYGTTPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 224)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGRFTISRDN</u> S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDL <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 225)
P10B06 g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>CRAS</u> <u>ESVSDLLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>YSRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC <u>QQYSASPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 226)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>SISGGGRSTYYADSVKGRFTISRDN</u> S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDL <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 227)
P5F7g2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>CRAS</u> <u>QSVSSNLAWY</u> QQKPGQAPRLLIY <u>DT</u> <u>FTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPPT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 228)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>AISSGGGRSTYYADSVKGRFTISRDN</u> S KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDL <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 229)

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
P5F7g3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QSVSSLL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>YTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC <u>QQYTGSPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 230)	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>AISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DL</u> <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 231)
P5F7g4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RAS</u> <u>QSVSSLL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>DA</u> <u>YTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC <u>QQYTGSPIT</u> FGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 232)	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYAMS</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>AISGGGRSTYYADSVKGR</u> FTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD <u>DL</u> <u>SPSDVGWGYGFDI</u> WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 233)

En la presente también se proporcionan porciones de CDR de dominios de unión al antígeno de anticuerpos contra FLT3 (que incluyen CDR Chothia, Kabat y regiones de contacto de CDR). La determinación de las regiones CDR está dentro del conocimiento de la técnica. Se entiende que, en algunas formas de realización, las CDR pueden ser una combinación de CDR Kabat y Chothia (también denominadas "CR combinadas" o "CDR extendidas"). En algunas formas de realización, las CDR son las CDR Kabat. En otras formas de realización, las CDR son las CDR Chothia. En otras palabras, en formas de realización con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de las CDR Kabat, Chothia de combinación o combinaciones de las mismas. La Tabla 2 proporciona ejemplos de secuencias de CDR proporcionadas en la presente.

Tabla 2

Cadena pesada			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
P4F6	SYGIS (SEQ ID NO: 37) (Kabat); GGTFGSY (SEQ ID NO: 38) (Chothia); GGTFGSYGIS (SEQ ID NO: 39) (Extendida)	GIIPFGTVTYAQKFQ G (SEQ ID NO: 40) (Kabat); IPIFGT (SEQ ID NO: 41) (Chothia)	DSWSGATGASDT (SEQ ID NO: 42)
P4C7	SYTIS (SEQ ID NO: 43) (Kabat);	GIIPAFGIANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 46)	GGSYSLDYFDI (SEQ ID NO: 48)

	GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia) GGTFSSYTIS (Extendida) (SEQ ID NO: 45)	(Kabat); IPAFGI (SEQ ID NO: 47) (Chothia)	
P3A1	SYDIS (SEQ ID NO: 49) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia); GGTFSSYDIS (SEQ ID NO: 50) (Extendida)	GIIPVSGRANYAQKF QG (SEQ ID NO: 51) (Kabat); IPVSGR (SEQ ID NO: 52) (Chothia)	VRPTYWPLDY (SEQ ID NO: 53)
P5A3	SYDIG (SEQ ID NO: 54) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 55) (Chothia); GGTFSSYDIG (SEQ ID NO: 56) (Extendida)	GIIPWFGTANYAQKF QG (SEQ ID NO: 57) (Kabat); IPWFGT (SEQ ID NO: 58) (Chothia)	DHHDSPSGYTSGG FDV (SEQ ID NO: 59)
P9B5	SYAMS (SEQ ID NO: 60) (Kabat); GFIFASY (SEQ ID NO: 61) (Chothia); GFIFASYAMS (SEQ ID NO: 62) (Extendida)	EISSSGGSTTYADSV KG (SEQ ID NO: 63) (Kabat); SSSGGS (SEQ ID NO: 64) (Chothia)	DRVMAGLGYPFD Y (SEQ ID NO: 65)
P9F1	SFAMS (SEQ ID NO: 66) (Kabat); GFIFSSF (SEQ ID NO: 67) (Chothia); GFIFSSFAMS (SEQ ID NO: 68) (Extendida)	DISGSGASTYYADSV KG (SEQ ID NO: 69) (Kabat); SGSGAS (SEQ ID NO: 70) (Chothia)	ASGGSGSYWPYMD P (SEQ ID NO: 71)
P1B4	RYALS (SEQ ID NO: 72) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 73) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 74) (Extendida)	GIIPMLGFANYAQKF QG (SEQ ID NO: 75) (Kabat); IPMLGF (SEQ ID NO: 76) (Chothia)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 77)
P1B11	SFDIS (SEQ ID NO: 78) (Kabat); GGTFRSF (SEQ ID NO: 79) (Extendida)	RIIPILGYANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 81) (Kabat);	DLGAPWAGYPFDP (SEQ ID NO: 83)

	79) (Chothia); GGTFRSFDIS (SEQ ID NO: 80) (Extendida)	IPILGY (SEQ ID NO: 82) (Chothia)	
P7H3	SYAMH (SEQ ID NO: 84) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 85) (Chothia); GFTFSSYAMH (SEQ ID NO: 86) (Extendida)	AISGSGGSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 87) (Kabat); SGSGGS (SEQ ID NO: 88) (Chothia)	GTRWWWGDAFDH (SEQ ID NO: 89)
P3E10	SYAIQ (SEQ ID NO: 90) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 91) (Chothia); GGTFSSYAIQ (SEQ ID NO: 92) (Extendida)	GIVGSWGLANYAQKF QG (SEQ ID NO: 93) (Kabat); VGSWGL (SEQ ID NO: 94) (Chothia)	SAFGELAS (SEQ ID NO: 95)
P1A5	RYALS (SEQ ID NO: 96) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 97) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 98) (Extendida)	GIIPMLGFANYAQKF QG (SEQ ID NO: 99) (Kabat); IPMLGF (SEQ ID NO: 100) (Chothia)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 101)
P5F7	SYAMN (SEQ ID NO: 102) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 104) (Extendida)	SISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 105) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 107)
P4H11	SYAMN (SEQ ID NO: 108) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 109) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 110) (Extendida)	SISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 111) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 112) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 113)
P15F7	NYAMN (SEQ ID NO: 114) (Kabat); GFTFNYY (SEQ ID NO: 115) (Chothia); GFTFNYYAMN (SEQ ID	VISGSGGTTYADSV KG (SEQ ID NO: 117) (Kabat); SGSGGT (SEQ ID NO: 118) (Chothia)	GIWDLRY (SEQ ID NO: 119)

	NO: 116) (Extendida)		
P12B6	SYAIS (SEQ ID NO: 120) (Kabat); GGTFMSY (SEQ ID NO: 121) (Chothia); GGTFMSY AIS (SEQ ID NO: 122) (Extendida)	GIIPIFGIAN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 123) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 124) (Chothia)	ETLIYPIPFEL (SEQ ID NO: 125)
P8B6	SYAVS (SEQ ID NO: 126) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 127) (Chothia); GGTFSSY AVS (SEQ ID NO: 128) (Extendida)	GIIPIFGIAN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 129) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 130) (Chothia)	EGIGGDLRYDGYDA (SEQ ID NO: 131)
P14G2	NYVMN (SEQ ID NO: 132) (Kabat); GFTFSNY (SEQ ID NO: 133) (Chothia); GFTFSNYVMN (SEQ ID NO: 134) (Extendida)	AISGSGATTYYADSV KG (SEQ ID NO: 135) (Kabat); SGSGAT (SEQ ID NO: 136) (Chothia)	GLWAGGI (SEQ ID NO: 137)
P7F9	SYAMS (SEQ ID NO: 138) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 139) (Chothia); GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 140) (Extendida)	AIGGSGGSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 141) (Kabat); GGSGGS (SEQ ID NO: 142) (Chothia)	DYYAFSDPAYGGM DV (SEQ ID NO: 143)
P08B06EE	SYAVS (SEQ ID NO: 126) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 127) (Chothia); GGTFSSY AVS (SEQ ID NO: 128) (Extendida)	GIIPIFGIAN YAQKFQ G (SEQ ID NO: 129) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 130) (Chothia)	EGIGGDLRYEGYDA (SEQ ID NO: 245)
P04A04	SYIIT (SEQ ID NO: 247) GGTFSSY (SEQ ID NO: 127) (Chothia) GGTFSSYIIT (SEQ ID NO: 246) (Extendida)	RIMPAFGWTNYAQKF QG (SEQ ID NO: 248) (Kabat) MPAFGW (SEQ ID NO: 249) (Chothia)	DEFGAFDV (SEQ ID NO: 250)
P01A05	RYALS (SEQ ID NO: 72) (Kabat);	IPMLGF (SEQ ID NO: 100) (Chothia)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 77)

	GGVFSRY (SEQ ID NO: 73) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 74) (Extendida)	GGIIPMLGFANYAQK FQG (SEQ ID NO: 251) (Kabat)	
P08B03	SYDIS (SEQ ID NO: 49) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia); GGTFSSYDIS (SEQ ID NO: 50) (Extendida)	RIIPSFGAANYAQKFQ G (SEQ ID NO: 253) (Kabat) IPSFGA (SEQ ID NO: 252) (Chothia)	DDGEGWTPPFGY (SEQ ID NO: 254)
P5F7g; P10A02g; P10A04g; P10A05g; P10A07g; P10B03g; P10B06g	SYAMN (SEQ ID NO: 102) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 104) (Extendida)	SISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 105) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 107)
P5F7g2; P5F7g3	SYAMN (SEQ ID NO: 102) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 104) (Extendida)	AISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 255) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 107)
P5F7g4	SYAMS (SEQ ID NO: 138) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 139) (Chothia); GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 140) (Extendida)	AISGGGRSTYYADSV KG (SEQ ID NO: 255) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWGYGF DI (SEQ ID NO: 107)
Cadena liviana			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
P4F6	RASHSVSSSYLA (SEQ ID NO: 144)	GASSRAT (SEQ ID NO: 145)	QQYGSPprt (SEQ ID NO: 146)
P4C7	RASQYVSASLLA (SEQ ID NO: 147)	GASTRAT (SEQ ID NO: 148)	QQYARSST (SEQ ID NO: 149)
P3A1	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 150)	AASSLQS (SEQ ID NO: 151)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 152)

P5A3	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 153)	EVSKRPS (SEQ ID NO: 154)	SSYAGSNTVV (SEQ ID NO: 155)
P9B5	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 156)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 157)	AAWDDSLSGVV (SEQ ID NO: 158)
P9F1	SGSGSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 159)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 160)	AAWDGSLSRPV (SEQ ID NO: 161)
P1B4	RASQSVNEQLA (SEQ ID NO: 162)	DASSRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYGSPPLT (SEQ ID NO: 164)
P1B11	RASQSVSSSCLA (SEQ ID NO: 165)	DASSRAT (SEQ ID NO: 166)	QQYDSSPLT (SEQ ID NO: 167)
P7H3	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 168)	YDSRPS (SEQ ID NO: 169)	QVWDSSTAWV (SEQ ID NO: 170)
P3E10	RASQSVSSCLA (SEQ ID NO: 171)	DASSRAT (SEQ ID NO: 172)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 173)
P1A5	RASQAVDSSCLA (SEQ ID NO: 174)	DAYTRPS (SEQ ID NO: 175)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 176)
P5F7	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 178)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 179)
P4H11	RASQSVSNTYLA (SEQ ID NO: 180)	DTSSRAT (SEQ ID NO: 181)	QQYGSSLT (SEQ ID NO: 182)
P15F7	RASQSISTYLN (SEQ ID NO: 183)	AASNLQS (SEQ ID NO: 184)	QQSYSIPLT (SEQ ID NO: 185)
P12B6	RASQIVSSSYLA (SEQ ID NO: 186)	GASSRAS (SEQ ID NO: 187)	QQYGGSPYT (SEQ ID NO: 188)
P8B6	RASQSVSHSYLA (SEQ ID NO: 189)	GASFRAA (SEQ ID NO: 190)	QQYGSDPYT (SEQ ID NO: 191)
P14G2	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 192)	DASDLQR (SEQ ID NO: 193)	QQSYNTPWT (SEQ ID NO: 194)
P7F9	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 195)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 196)	QVWDSSSDHWV (SEQ ID NO: 197)
P08B06EE	RASQSVSHSYLA (SEQ ID NO: 189)	GASFRAA (SEQ ID NO: 190)	QQYGSEPYT (SEQ ID NO: 256)
P04A04	RASQSVTSSCLA (SEQ ID NO: 257)	GASFRAA (SEQ ID NO: 190)	QQYGSSLLIT (SEQ ID NO: 258)
P01A05	RASQAVDSSCLA (SEQ ID NO: 174)	DAYTRPS (SEQ ID NO: 175)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 176)
P08B03	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYGGSPYT (SEQ ID NO: 260)

P5F7g	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 178)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 179)
P10A02g	RASQDVSDLLA (SEQ ID NO: 261)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYASSPIT (SEQ ID NO: 262)
P10A04g	RASQKVSDLLA (SEQ ID NO: 263)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYTGSPIT (SEQ ID NO: 264)
P10A05g	RASLSVSDLLA (SEQ ID NO: 265)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 266)	QQYSSNPIT (SEQ ID NO: 267)
P10A07g	RASGSVSDLLA (SEQ ID NO: 268)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 266)	QQYASYPIT (SEQ ID NO: 269)
P10B03g	RASQSVSDLLA (SEQ ID NO: 270)	DAFSRAT (SEQ ID NO: 271)	QQYGTTPIT (SEQ ID NO: 272)
P10B06g	RASESVSDLLA (SEQ ID NO: 273)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 266)	QQYASAPIT (SEQ ID NO: 274)
P5F7g2	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 178)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 179)
P5F7g3; P5F7g4	RASQSVSSLLA (SEQ ID NO: 275)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYTGSPIT (SEQ ID NO: 264)

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a FLT3 y compite con el anticuerpo de acuerdo con lo descrito en la presente, que incluye P4F6, P4C7, P3A, P5A3, P9B5, P9F1, P1B4, P1B11, 5 P7H3, P3E10, P1A5, P5F7, P4H11, P15F7, P12B6, P8B6, P14G2, P7F9, P08B06EE, P04A04, P01A05, P08B03, P5F7, P5F7g, P10A02g, P10A04g, P10A05g, P10A07g, P10B03g, P10B06g, P5F7g2, P5F7g3, o P5F7g4.

En algunas formas de realización, la invención también proporciona porciones de CDR de anticuerpos a anticuerpos FLT3 sobre la base de las regiones de contacto de CDR. Las regiones de contacto de CDR son regiones de un anticuerpo que 10 infunden especificidad al anticuerpo por un antígeno. En general, las regiones de contacto de CDR incluyen las posiciones de residuos en las CDR y las zonas de Vernier que están restringidas para mantener la estructura de bucle adecuada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. Véase, por ejemplo, Makabe *et al.*, 15 J. Biol. Chem., 283:1156-1166, 2007. La determinación de las regiones de contacto CDR está dentro de la experiencia de la técnica.

La afinidad de unión (K_D) del anticuerpo FLT3 de acuerdo con lo descrito en la presente a FLT3 (tal como FLT3 humano (por ejemplo, (SEQ ID NO: 201)) puede ser aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5000 nM. En algunas formas de

realización, la afinidad de unión es aproximadamente cualquiera de 5000 nM, 4500 nM, 4000 nM, 3500 nM, 3000 nM, 2500 nM, 2000 nM, 1789 nM, 1583 nM, 1540 nM, 1500 nM, 1490 nM, 1064 nM, 1000 nM, 933 nM, 894 nM, 750 nM, 705 nM, 678 nM, 532 nM, 500 nM, 494 nM, 400 nM, 349 nM, 340 nM, 353 nM, 300 nM, 250 nM, 244 nM, 231 nM, 225 nM, 207 nM, 200 nM, 186 nM, 172 nM, 136 nM, 113 nM, 104 nM, 101 nM, 100 nM, 90 nM, 83 nM, 79 nM, 74 nM, 54 nM, 50 nM, 45 nM, 42 nM, 40 nM, 35 nM, 32 nM, 30 nM, 25 nM, 24 nM, 22 nM, 20 nM, 19 nM, 18 nM, 17 nM, 16 nM, 15 nM, 12 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7.5 nM, 7 nM, 6.5 nM, 6 nM, 5.5 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, o 0,001 nM. En algunas formas de realización, la afinidad de unión es menor de aproximadamente cualquiera de 5000 nM, 4000 nM, 3000 nM, 2000 nM, 1000 nM, 900 nM, 800 nM, 250 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 7,5 nM, 7 nM, 6,5 nM, 6 nM, 5 nM, 4,5 nM, 4 nM, 3,5 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1 nM, o 0,5 nM.

Los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, pueden prepararse mediante el uso de los anticuerpos descritos en la presente. Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210, 1986). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basó en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Millstein y Cuello, *Nature* 305, 537-539, 1983). Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona un anticuerpo biespecífico donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo humano de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, FLT3), y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmune humana.

La célula efectora inmune humana puede ser cualquiera de una variedad de células efectoras inmunes conocidas en la técnica. Por ejemplo, la célula efectora inmune puede ser un miembro del linaje de células linfoides humanas, que incluye, pero sin limitación, una célula T (por ejemplo, una célula T citotóxica), una célula B, y una célula citolítica natural (NK). La célula efectora inmune también puede ser, por ejemplo, sin limitación, un miembro del linaje mielóide humano, que incluye, pero sin limitación, un monocito, un granulocito neutrofílico y una célula dendrítica. Dichas

células efectoras inmunes pueden tener un efecto citotóxico o apoptótico sobre una célula diana u otro efecto deseado tras la activación mediante la unión de un antígeno efector.

5 El antígeno efector es un antígeno (por ejemplo, una proteína o un polipéptido) que se expresa en la célula efectora inmune humana. Los ejemplos de antígenos efectores que pueden unirse mediante la proteína heterodimérica (por ejemplo, un anticuerpo heterodimérico o un anticuerpo biespecífico) incluyen, pero sin limitación, el complejo CD3 humano (o CD3 (Grupo de diferenciación)), CD16, NKG2D, NKp46, CD2, CD28, CD25, CD64 y CD89.

10 La célula diana puede ser una célula que sea nativa o extraña a los seres humanos. En una célula diana nativa, la célula puede haberse transformado para ser una célula maligna o patológicamente modificada (por ejemplo, una célula diana nativa infectada con un virus, un plasmodio o una bacteria). En una célula diana extraña la célula es un patógeno invasor, tal como una bacteria, un plasmodio o un virus.

15 El antígeno diana se expresa en una célula diana en una condición enferma (por ejemplo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa (por ejemplo, cáncer), un trastorno inmunológico, una enfermedad neurológica, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa (por ejemplo, una infección viral o una infección parasitaria), una reacción alérgica, una enfermedad de injerto contra huésped o una enfermedad de huésped versus injerto).
20 Un antígeno diana no es un antígeno efector. En algunas formas de realización, el antígeno diana es FLT3.

En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que
25 comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana, y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmune humana, donde el primer dominio variable del
30 anticuerpo se une al dominio 4 de FLT3 que comprende SEQ ID NO: 279.

En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico, donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana, y que comprende un segundo dominio
35 variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de

una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmune humana, donde el primer dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO:

5 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, o 233; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, o 232.

10 En algunas formas de realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico, donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana, y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de

15 una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmune humana, donde el primer dominio variable del anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60,

20 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 246, o 247; (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 248,

25 249, 251, 252, 253, o 255; y iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 245, 250, o 254; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183,

30 186, 189, 192, 195, 257, 261, 263, 265, 268, 270, 273, o 275; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 259, 266, o 271; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 256, 258,

35 260, 262, 264, 267, 269, 272, o 274.

En algunas formas de realización, el primer dominio variable del anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 102, 103, o 104; (ii) una CDR2 VH que
5 comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 255 o 106; y (iii) una CDR3 VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 107; y/o (b) una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 177; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 178; y (iii) una CDR3 VL que comprende la
10 secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 179.

En algunas formas de realización, el segundo dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 282; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y
15 CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 281.

En algunas formas de realización, el primer dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 229; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y
20 CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 228; y un segundo dominio variable del anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 282; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende a CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 281.

En algunas formas de realización, el segundo dominio variable del anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante complementaria VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 285, 286, o 287; (ii) una CDR2 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 288 o 289; y (iii) una CDR3 VH que
30 comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 290; y/o (b) una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 291; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 292; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 234.

35 La Tabla 3 muestra las secuencias específicas de aminoácidos y ácidos

nucleicos del segundo dominio variable del anticuerpo, que es específico de CD3. En la Tabla 3, las secuencias subrayadas son secuencias CDR de acuerdo con Kabat y en negrita de acuerdo con Chothia.

Tabla 3

mAb	Cadena liviana	Cadena pesada
h2B4_H NPS_VL _TK	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ <u>SLFNVRSRKNYLA</u> WYQQKPGQPPL LIS <u>WASTRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYC <u>KQSYDLFT</u> FGS GTKLEIK (SEQ ID NO: 281)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDY YMTWVRQAPGKGLEWVA <u>FIRNRARGYTSDHNPSVKGRFTISR</u> D NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRPSYYVLDY WGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO:282)
h2B4_H NPS_VL _TK	GACATTGTGATGACTCAATCCCCCG ACTCCCTGGCTGTGTCCCTCGGCGA ACGCGCAACTATCAACTGTAAAAGC AGCCAGTCCCTGTTCAACGTCCGGT CGAGGAAGAACTACCTGGCCTGGTA TCAGCAGAAACCTGGGCAGCCGCC GAAGCTTCTGATCTCATGGGCCTCA ACTCGGGAAAGCGGAGTGCCAGATA GATTCTCCGGATCTGGCTCCGGAAC CGACTTCACCCTGACGATTTCGAGC TTGCAAGCGGAGGATGTGGCCGTGT ACTACTGCAAGCAGTCCTACGACCT CTTCACCTTTGGTTCGGGCACCAAG CTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 283)	GAAGTCCAACCTTGTCTGAATCGGGA GGAGGCCTTGTGCAACCCGGTGGGA TCCCTGAGGCTGTCTATGCGCGGCC TCGGGCTTCACCTTTTCCGATTACT ACATGACCTGGGTCAGACAGGCC CTGGAAAGGGGTGGAATGGGTGG CATTTCATCCGGAATAGAGCCCGCG GATACACTTCCGACCACAACCCCA GCGTGAAGGGGCGGTTACCATTA GCCGCGACAACGCCAAGAACTCCC TCTACCTCCAAATGAACAGCCTGCG GGCGGAGGATACCGCTGTGTACTA CTGCGCCCGCGACCGGCCGTCCTA CTATGTGCTGGACTACTGGGGCCA GGGTACTACGGTCACCGTCTCTCTC A (SEQ ID NO: 284)

5

La Tabla 4 muestra los ejemplos de las secuencias de CDR del segundo dominio variable del anticuerpo, que es específico para CD3.

Tabla 4

Cadena pesada			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
h2B4_HN PS_VL_T K	SDYYMT (SEQ ID NO: 285) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO:	RNRARGYT (SEQ ID NO: 288) (Kabat) FIRNRARGYTSDHNPSVKG	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 290)

	286) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 287) (Extendida)	(SEQ ID NO: 289) (Extendida)	
Cadena liviana			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
h2B4_HN PS_VL_T K	KSSQSLFNVRSRKNYL A (SEQ ID NO: 291)	WASTRES (SEQ ID NO: 292)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 234)

En algunas formas de realización, un anticuerpo biespecífico proporcionado en la presente que contiene un dominio variable específico de CD3 que tiene una secuencia anti-CD3 como se proporciona en la Publicación U. S. N.º 20160297885, que se incorpora en la presente por referencia para todos los propósitos.

De acuerdo con un enfoque para fabricar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de la región constante de inmunoglobulina. La fusión con preferencia es con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena liviana, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena liviana de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en formas de realización cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las relaciones no tienen una importancia particular.

En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Esta estructura

asimétrica, con una cadena liviana de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación PCT N.º WO 94/04690.

5 En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por modificación de aminoácidos en la primera región bisagra en una rama, y el aminoácido sustituido/reemplazado en la primera región bisagra tiene una carga opuesta al aminoácido correspondiente en la segunda región bisagra en otra rama. Este enfoque se describe en la Solicitud de patente internacional N.º
10 PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

 En otro enfoque, la formación de una proteína heteromimérica o heterodímera deseada (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) se mejora mediante la alteración o manipulación genética de una interfaz entre una primera y una segunda región Fc de tipo inmunoglobulina (por ejemplo, una región bisagra y/o una región CH3) En este
15 enfoque, los anticuerpos biespecíficos pueden estar compuestos por una región CH3, donde la región CH3 comprende un primer polipéptido CH3 y un segundo polipéptido CH3 que interactúan de manera conjunta para formar una interfaz CH3, donde uno o más aminoácidos dentro de la interfaz CH3 desestabilizan la formación de homodímeros y no son electrostáticamente desfavorables a la formación de
20 homodímeros. Este enfoque se describe en la Solicitud de patente internacional N.º PCT/US2011/036419 (WO2011/143545).

 En otro enfoque, los anticuerpos biespecíficos se pueden generar mediante el uso de un marcador peptídico que contiene glutamina manipulado genéticamente para el anticuerpo dirigido a un epítipo (por ejemplo, FLT3) en una rama y otro marcador
25 peptídico (por ejemplo, un marcador peptídico que contiene Lys o una Lys endógena reactiva) manipulado genéticamente para un segundo anticuerpo dirigido a un segundo epítipo en otra rama en presencia de transglutaminasa. Este enfoque se describe en la Solicitud de patente internacional N.º PCT/IB2011/054899 (WO2012/059882).

30 En algunas formas de realización, la proteína heterodimérica (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) de acuerdo con lo descrito en la presente comprende un anticuerpo humano de longitud completa, donde un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico se une específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, FLT3), y comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del
35 anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune

humana mediante la unión específica a un antígeno efector (por ejemplo, CD3) ubicado en la célula efectora inmune humana, donde el primer y el segundo dominio variable del anticuerpo de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 223, 225, y 228 (por ejemplo, (C223E o C223R),
5 (E225E o E225R), y (P228E o P228R)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, K409R o L368E (esquema de numeración EU)) en la región CH3 de IgG2 (SEQ ID NO: 236).

En algunas formas de realización, el primer y el segundo dominio variable del anticuerpo de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos
10 en las posiciones 221 y 228 (por ejemplo, (D221R o D221E) y (P228R or P228E)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, K409R o L368E (esquema de numeración EU)) en la región CH3 de IgG1 humana (SEQ ID NO: 237).

En algunas formas de realización, el primer y el segundo dominio variable del anticuerpo de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos
15 en las posiciones 228 (por ejemplo, (P228E o P228R)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, R409 o L368E (esquema de numeración EU)) en la región CH3 de IgG4 humana (SEQ ID NO: 238).

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab,
20 Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, proteínas de fusión de cadena simple (ScFv), mutantes de la misma, que comprenden una porción de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno
25 de la especificidad requerida, que incluye variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser de origen murinos, de rata, humanos o de cualquier otro tipo (que incluye anticuerpos quiméricos o humanizados).

En algunas formas de realización, el anticuerpo monoespecífico FLT3 o el
30 anticuerpo biespecífico FLT3 (por ejemplo, FLT3-CD3) de acuerdo con lo descrito en la presente es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, el anticuerpo monoespecífico FLT3 es un anticuerpo monoclonal humano. En otro ejemplo, la rama de FLT3 del anticuerpo biespecífico FLT3-CD3 es un anticuerpo monoclonal humano, y la rama de CD3 del anticuerpo biespecífico FLT3-CD3 es un anticuerpo monoclonal humanizado.

35 En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región

constante modificada, tal como, por ejemplo, sin limitación, una región constante que tiene un potencial aumentado para provocar una respuesta inmune. Por ejemplo, la región constante se puede modificar para tener una afinidad aumentada a un receptor gamma Fc tal como, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIA, o FcγRIII.

5 En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que está inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmunitaria. En algunas formas de realización, la región constante se modifica de acuerdo con lo descrito en Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999; Solicitud de PCT N.º PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de patente del Reino Unido N.º 98099518. La Fc puede ser IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, o IgG4 humana. La Fc puede ser IgG2 humana que contiene la mutación A330P331 en S330S331 (IgG2Δa), en que los residuos se numeran con referencia a la secuencia de IgG2 tipo salvaje. Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999. En algunas formas de realización, el anticuerpo
10 comprende una región constante de IgG₄ que comprende las siguientes mutaciones (Armour *et al.*, Molecular Immunology 40 585-593, 2003): E233F234L235 a P233V234A235 (IgG4Δc), en el cual la numeración es con referencia a la IgG4 tipo salvaje. En otra realización más, la Fc es IgG4 humana E233F234L235 a P233V234A235 con supresión G236 (IgG4Δb). En otra forma de realización, la Fc es
15 cualquier IgG4 Fc humana (IgG4, IgG4Δb y IgG4Δc) que contiene la mutación estabilizadora de bisagra S228 a P228 (Aalberse *et al.*, Immunology 105, 9-19, 2002). En otra forma de realización, la Fc puede ser Fc aglicosilada.

 En algunas formas de realización, la región constante es aglicosilada por la mutación del residuo de unión de oligosacárido (tal como Asn297) y/o residuos
25 flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de glicosilación en la región constante. En algunas formas de realización, la región constante es aglicosilada para glicosilación ligada a N enzimáticamente. La región constante puede ser aglicosilada para glicosilación ligada a N enzimáticamente o mediante la expresión en una célula huésped deficiente en glicosilación.

30 En algunas formas de realización, la región constante tiene una región constante modificada que elimina o reduce la unión del receptor gamma Fc. Por ejemplo, la Fc puede ser IgG2 humana que contiene la mutación D265, en que los residuos de aminoácidos se numeran con referencia a la secuencia de IgG2 tipo salvaje (SEQ ID NO: 236). Por consiguiente, en algunas formas de realización, la
35 región constante tiene una región constante modificada que tiene la secuencia

mostrada en la SEQ ID NO: 239.

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVRKCRVRCPCRPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
5 EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.Y el ácido nucleico
que codifica la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 239 se muestra en la SEQ ID
NO: 240.

10 En algunas formas de realización, la región constante tiene una región
constante modificada que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 241:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVRKCEVECPECPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
15 EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.Y el ácido nucleico
que codifica la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 241 se muestra en la SEQ ID
NO: 242.

20 El aminoácido de la región constante Kappa humana se muestra en la SEQ ID
NO: 243:

GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC. Y el ácido
nucleico que codifica la secuencia de la SEQ ID NO: 243 se muestra en la SEQ ID NO:
25 244.

Una forma de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos contra FLT3
es mediante la medición de la afinidad de unión del anticuerpo bivalente a la proteína
FLT3 monomérica. La afinidad de un anticuerpo FLT3 se puede determinar mediante
resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial
30 (SPR) Biacore™3000™, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipado con Fc anti-ratón
pre-inmovilizado o Fc antihumana mediante el uso de tampón de corrida HBS-EP
(HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 0,005% v/v). El
dominio extracelular FLT3 humano marcado con 8-histidina monomérico se puede
diluir en tampón HBS-EP a una concentración menor de 0,5 µg/mL e inyectar a través
35 de canales de chip individuales mediante el uso de tiempos de contacto variables, para

alcanzar dos intervalos de densidad de antígeno, o bien 50-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados u 800-1,000 RU para ensayos de detección. Los estudios de regeneración han demostrado que 25 mM de NaOH en etanol al 25% v/v elimina con eficacia la proteína FLT3 unida a la vez que mantiene la actividad de los anticuerpos FLT3 en el chip durante más de 200 inyecciones. Típicamente, se inyectan diluciones en serie (concentraciones que abarcan de K_D estimadas 0,1-10x) de muestras de FLT3 marcadas con 8-histidina durante 1 minuto a 100 μ L/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas FLT3 se determinan por absorbancia a 280 nm en función del coeficiente de extinción específico de la secuencia de la proteína FLT3 marcada con 8-histidina. Las tasas de asociación cinética (k_{on} o k_a) y las tasas de disociación (k_{off} o k_d) se obtienen simultáneamente mediante el ajuste de datos globalmente a un modelo de unión Langmuir 1: 1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. 1994). Methods Enzymology 6. 99-110) mediante el uso del programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para usar en determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier FLT3 monomérico, que incluye FLT3 humano, FLT3 de otro mamífero (tal como FLT3 de ratón, FLT3 de rata o FLT3 de primate), así como diferentes formas de FLT3 (por ejemplo, FLT3 glicosilado). La afinidad de unión de un anticuerpo generalmente se mide a 25 °C, pero también se puede medir a 37 °C.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. Para la producción de líneas celulares de hibridoma, la vía y el programa de inmunización del animal huésped generalmente están en consonancia con las técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, de acuerdo con lo descrito adicionalmente en la presente. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la técnica y/o se describen en la presente.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero que incluya seres humanos o células productoras de anticuerpos a partir del mismo se puede manipular para que sirva de base para la producción de líneas celulares de mamíferos, que incluyen humanas y hibridomas. Típicamente, el animal huésped se inyecta por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmicamente con una cantidad de inmunógeno, que incluye de acuerdo con lo descrito en la presente.

Los hibridomas pueden prepararse a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas mediante el uso de la técnica de hibridación de células somáticas

general de Kohler, B. y Milstein, C., Nature 256: 495-497, 1975 o como se modifica por Buck, DW, *et al.*, In Vitro, 18:377-381, 1982. Se pueden usar en la hibridación líneas de mieloma disponibles, que incluyen, pero no se limitan a X63-Ag8.653 y aquellas del Instituto Salk, Cell Distribution Center, San Diego, California, Estados Unidos de América. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides mediante el uso de un fusógeno tal como polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y crecen en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células progenitoras no híbridas. Cualquiera de los medios descritos en la presente, complementados con o sin suero, se puede usar para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, las células B inmortalizadas con EBV se pueden usar para producir los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se analizan para determinar la actividad antiinmunogénica mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que se pueden usar como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células de progenie de los hibridomas progenitores que producen anticuerpos monoclonales específicos para FLT3, o porciones de los mismos.

Los hibridomas que producen tales anticuerpos se pueden cultivar *in vitro* o *in vivo* mediante el uso de procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar de los medios de cultivo o fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, se puede eliminar, por ejemplo, mediante el paso de la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida y la elución o liberación de los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con células que expresan FLT3 humana, una proteína FLT3 humana, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada a una proteína que es inmunogénica en la especie para inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja mediante el uso de un agente bifuncional o derivatización, por ejemplo, un éster de maleimidobenzoyl sulfosuccinimida (conjugación a través de

residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son diferentes grupos alquilo, pueden producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

5 Si se desea, el anticuerpo (monoclonal o policlonal) de interés se puede secuenciar y la secuencia de polinucleótidos luego se puede clonar en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en el vector en una célula huésped y luego la célula huésped se puede expandir y congelar para uso futuro. La producción de anticuerpos
10 monoclonales recombinantes en cultivo celular se puede llevar a cabo a través de la clonación de genes de anticuerpos de células B por medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Tiller *et al.*, J. Immunol. Methods 329, 112, 2008; Patente U. S. 7.314.622.

En una alternativa, la secuencia de polinucleótidos se puede usar para la
15 manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante se puede manipular genéticamente para asemejarse más a regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpo
20 para obtener una mayor afinidad por FLT3 y una mayor eficacia en la inhibición de FLT3.

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1) determinar el nucleótido y la secuencia de aminoácidos predicha de los dominios variables livianos y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el
25 anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región estructural del anticuerpo utilizar durante el proceso de humanización (3) metodologías/técnicas reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes U. S. N.º 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

30 Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, que incluye anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o roedor modificadas y sus CDR asociadas fusionadas a regiones constantes humanas. Véase, por ejemplo, Winter *et al.* Nature 349: 293 - 299, 1991, Lobuglio *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. Sci. Estados Unidos de América 86: 4220 - 4224, 1989, Shaw *et al.* J Immunol.
35

138: 4534 - 4538, 1987, y Brown *et al.* Cancer Res. 47: 3577-3583, 1987. Otras referencias describen CDR de roedores injertadas en una región estructural (FR) de soporte humano antes de la fusión con una región constante de anticuerpo humano apropiada. Véase, por ejemplo, Riechmann *et al.* Nature 332:323-327, 1988, 5 Verhoeyen *et al.* Science 239:1534-1536, 1988, y Jones *et al.* Nature 321:522-525, 1986. Otra referencia describe CDR de roedores soportados por regiones estructurales de roedor manipuladas genéticamente de manera recombinante. Véase, por ejemplo, la Publicación de patente europea N.º 0519596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de 10 anticuerpos antihumanos de roedores que limita la duración y efectividad de las aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo se puede manipular genéticamente de manera que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no activa la lisis de complemento). Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N.º PCT/GB99/01441; la Solicitud de patente del 15 Reino Unido N.º 9809951.8. Otros métodos de humanización de anticuerpos que también se pueden utilizar se describen en Daugherty *et al.*, Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476, 1991, y en las patentes U. S. N.º 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la Publicación PCT N.º WO 01/27160.

Los principios generales relacionados con los anticuerpos humanizados 20 analizados anteriormente también son aplicables a la adaptación de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Además, se pueden combinar uno o más aspectos de humanización de un anticuerpo descrito en la presente memoria, por ejemplo, injertos de CDR, mutación de estructura y mutación de CDR.

25 En una variación, se pueden obtener anticuerpos completamente humanos mediante el uso de ratones disponibles comercialmente que se han manipulado genéticamente para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. También se pueden utilizar animales transgénicos que están diseñados para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente 30 humanos) o más robusta para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Los ejemplos de dicha tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante y expresarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica. En otra 35 alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de manera recombinante mediante

tecnología de despliegue en fagos. Véase, por ejemplo, las Patentes U. S. N.º 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; e Winter *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455, 1994. Alternativamente, se puede usar la tecnología de despliegue en fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553, 1990) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de los repertorios génicos del dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no vacunados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio del anticuerpo V se clonan en marco en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se despliegan como fragmentos funcionales de anticuerpos en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena simple del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. El despliegue en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564 - 571, 1993. Se pueden usar varias fuentes de segmentos del gen V para el despliegue en fagos. Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628, 1991, aislaron una diversidad de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una gran variedad de antígenos (que incluye autoantígenos) al seguir esencialmente las técnicas descritas por Mark *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991, o Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734, 1993. En una respuesta inmune natural, los genes del anticuerpo acumulan mutaciones a una tasa alta (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad, y los linfocitos B que presentan inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y diferencian preferentemente durante la exposición posterior al antígeno. Este proceso natural puede imitarse mediante el empleo de la técnica conocida como "intercambio de cadenas" (Marks *et al.*, Bio/Technol., 10: 779-783, 1992). En este método, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por despliegue en fagos se puede mejorar mediante el reemplazo secuencial de los genes de la región V de la cadena pesada y liviana con repertorios de variantes naturales (repertorios) de genes del dominio V obtenidos a partir de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo

pM-nM. Una estrategia para obtener repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocida como "la mayor biblioteca") ha sido descrita por Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res. 21:2265-2266, 1993. También se puede usar intercambio de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impresión de epítopo", el gen del dominio V de cadena pesada o liviana de anticuerpos de roedor obtenidos mediante la técnica de despliegue en fagos se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, lo que genera quimeras de roedor-humano. La selección en el antígeno produce el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restablecer un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítopo gobierna (imprime) la elección del compañero. Cuando se repite el proceso para reemplazar el dominio V del roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la Publicación PCT N.º WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos de roedores mediante el injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos estructurales o de CDR de origen de roedores.

Los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante mediante el aislamiento en primer lugar de los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de los animales huésped, la obtención de la secuencia del gen y el uso de la secuencia del gen para expresar el anticuerpo de forma recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro método que se puede emplear es expresar la secuencia de anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito métodos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, *et al.* Vaccine 19: 2756, 2001; Lonberg, N. y D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65, 1995; y Pollock, *et al.*, J Immunol Methods 231:147, 1999. Los métodos para producir derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena simple, etc. son conocidos en la técnica.

También se pueden emplear inmunoensayos y técnicas de clasificación por citometría de flujo tales como la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos para FLT3, o antígenos tumorales de interés.

Los anticuerpos descritos en la presente se pueden unir a muchos portadores diferentes. Los portadores pueden ser activos y/o inertes. Los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon,

amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la técnica sabrán de otros portadores adecuados para la unión de anticuerpos, o podrán determinarlos, mediante el uso de la experimentación de rutina. En algunas formas de realización, el portador comprende un resto que se dirige al miocardio.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencía fácilmente mediante el uso de procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión (tales como vectores de expresión descritos en la Publicación PCT N.º WO 87/04462), que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 87/04462. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias codificadoras de las regiones constantes humanas de cadena pesada y liviana en lugar de secuencias murinas homólogas, Morrison *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984, o mediante la unión covalente de la secuencia codificadora de la inmunoglobulina a la totalidad o parte de la secuencia codificadora para un polipéptido no inmunoglobulínico. De esa manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal en la presente.

Los anticuerpos FLT3 descritos en la presente se pueden identificar o caracterizar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, por medio del cual se detectan y/o se miden la reducción de los niveles de expresión de FLT3. En algunas formas de realización, un anticuerpo de FLT3 se identifica mediante la incubación de un agente candidato con FLT3 y control de la unión y/o la reducción concomitante de los niveles de expresión de FLT3. El ensayo de unión se puede realizar con polipéptidos FLT3 purificados, o con células que expresan de forma natural, o transfectan para expresar, los polipéptidos FLT3. En una forma de realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva, donde se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo FLT3 conocido

por la unión a FLT3. El ensayo se puede realizar en varios formatos, incluido el formato ELISA.

Después de la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo FLT3 candidato se puede confirmar y refinar adicionalmente mediante bioensayos, conocidos por analizar las actividades biológicas específicas. Alternativamente, los bioensayos se pueden usar para seleccionar candidatos directamente. Algunos de los métodos para identificar y caracterizar los anticuerpos se describen en detalle en los Ejemplos.

Los anticuerpos FLT3 se pueden caracterizar mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método es identificar el epítipo al que se une, o "mapeo de epítipos". Existen muchos métodos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la localización de epítipos en proteínas, que incluyen la resolución de la estructura cristalina de un complejo de anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos de genes y ensayos sintéticos basados en péptidos, de acuerdo con lo descrito, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, se puede usar el mapeo de epítipos para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo. El mapeo de epítipos está disponible comercialmente de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en una extensión única de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que puede no estar necesariamente contenida en una extensión única. Los péptidos de longitudes variables (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, de forma recombinante) y usar para ensayos de unión con un anticuerpo FLT3 u otro antígeno tumoral. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo FLT3 se puede determinar en un análisis sistemático mediante el uso de péptidos superpuesto derivado de la secuencia FLT3 y determinar la unión con el anticuerpo FLT3. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos de genes, el marco de lectura abierto que codifica FLT3 está fragmentado de forma aleatoria o mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de FLT3 con el anticuerpo a analizar. Los fragmentos de genes, por ejemplo, se pueden producir por PCR y luego transcribir y traducir en proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo al FLT3 marcado radiactivamente se determina luego por

inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítomos también se pueden identificar mediante el uso de bibliotecas grandes de secuencias de péptidos aleatorias desplegadas en la superficie de partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Alternativamente, se puede analizar una biblioteca definida de fragmentos peptídicos superpuestos para determinar la unión al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simple. En un ejemplo adicional, la mutagénesis de un dominio de unión al antígeno, los experimentos de intercambio de dominio y la mutagénesis de barrido de alanina se pueden realizar para identificar los residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión del epítomo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominio se pueden realizar mediante el uso de un FLT3 mutante en el que varios fragmentos de la proteína FLT3 se han reemplazado (intercambiados) con secuencias de FLT3 de otra especie (por ejemplo, ratón) o una proteína estrechamente relacionada pero antigénicamente distinta. Al evaluar la unión del anticuerpo al FLT3 mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento FLT3 particular para la unión del anticuerpo. En el caso del anticuerpo específico para FLT3 (es decir, el anticuerpo que no se une a FLT3wt (tipo salvaje) o cualquier otra proteína), se puede deducir el epítomo a partir del alineamiento de secuencia de FLT3 a FLT3wt.

Otro método adicional que se puede usar para caracterizar un anticuerpo FLT3 es usar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos en FLT3, para determinar si el anticuerpo FLT3 se une al mismo epítomo que otros anticuerpos. Los ensayos de competición son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Se puede usar un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo FLT3. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, Patentes U. S. N.º 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, que incluye inyección, administración oral, pistola de partículas o administración por cateterización, y administración tópica. En otra forma de realización, el vector de expresión se administra directamente al tronco o ganglio simpático, o en una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

También se puede usar la administración dirigida de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de administración de ADN mediadas por receptor se describen en, por ejemplo, Findeis *et al.*, Trends Biotechnol., 1993, 11:202; Chiou *et al.*, Gene

Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer, J. A. Wolff, ed., 1994; Wu *et al.*, J. Biol. Chem., 263:621, 1988; Wu *et al.*, J. Biol. Chem., 269:542, 1994; Zenke *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3655, 1990; y Wu *et al.*, J. Biol. Chem., 266:338, 1991. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. Los intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN también se pueden usar durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos se pueden administrar mediante el uso de vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen viral o no viral (véase en general, Jolly, Cancer Gene Therapy, 1:51, 1994; Kimura, Human Gene Therapy, 5:845, 1994; Connelly, Human Gene Therapy, 1995, 1:185, y Kaplitt, Nature Genetics, 6:148, 1994). La expresión de tales secuencias codificadoras se puede inducir mediante el uso de promotores endógenos o heterólogos de mamíferos. La expresión de la secuencia codificadora puede ser constitutiva o regulada.

Los vectores basados en virus para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de vehículos basados en virus incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes U. S. N.º 5.219.740 y 4.777.127; Patente GB N.º 2.200.651; y Patente EP N.º 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR -532)), y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También se puede emplear la administración de ADN unido a adenovirus muerto de acuerdo con lo descrito en Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147.

También se pueden emplear vehículos y métodos de administración no virales, que incluyen, pero sin limitación, ADN condensado policatiónico unido o no unido a adenovirus inactivado solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther., 3:147,

1992); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem., 264:16985, 1989); células de vehículos de administración de células eucarióticas (véase, por ejemplo, las patentes U. S. N.º 5.814.482, publicaciones PCT N.º. WO 95/07994, WO 96/17072, WO 95/30763 y WO 97/42338) y neutralización de la carga nucleica o fusión
5 con membranas celulares. También se puede emplear ADN desnudo. Los ejemplos de métodos de introducción de ADN desnudo se describen en la Publicación PCT N.º WO 90/11092 y en la Patente U. S. N.º 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de administración de genes se describen en la patente U. S. N.º 5.422.120; Publicaciones PCT N.º. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y EP 0524968.
10 Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell Biol., 14:2411, 1994 y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:1581, 1994.

En algunas formas de realización, la invención abarca composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos descritos en la presente o fabricados por los métodos y que tienen las características descritas en la
15 presente. Como se usa en la presente, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a FLT3, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son bien conocidos en la
20 técnica.

La invención también proporciona métodos para fabricar cualquiera de estos anticuerpos. Los anticuerpos de esta invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos se pueden producir por degradación proteolítica u otro tipo de degradación de los anticuerpos, por métodos
25 recombinantes (es decir, polipéptidos únicos o de fusión) como se describió anteriormente o por síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente mediante síntesis química. Los métodos de síntesis química son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.
30 Por ejemplo, un anticuerpo se puede producir mediante un sintetizador polipeptídico automático que emplea el método de fase sólida. Véase también, Patentes U. S. N.º 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415.

En otra alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de forma recombinante mediante el uso de procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En una
35 forma de realización, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las

regiones variables de cadena pesada y/o cadena liviana del anticuerpo P4F6, P4C7, P3A`, P5A3, P9B5, P9F1, P1B4, P1B11, P7H3, P3E10, P1A5, P5F7, P4H11, P15F7, P12B6, P8B6, P14G2, P7F9, P08B06EE, P04A04, P01A05, P08B03, P5F7, P5F7g, P10A02g, P10A04g, P10A05g, P10A07g, P10B03g, P10B06g, P5F7g2, P5F7g3, o
5 P5F7g4. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula huésped y la célula huésped se puede expandir y congelar para uso futuro. Los vectores (que incluyen vectores de expresión) y las células huésped se describen adicionalmente en la presente.

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos
10 covalentemente, también están dentro del alcance de la invención. Dichos anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente U. S. N.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (Publicaciones PCT N.º. WO 91/00360 y WO 92/200373; EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden obtener con cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de
15 reticulación adecuados y las técnicas son bien conocidos en la técnica, y se describen en la patente U. S. N.º 4.676.980.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también se pueden preparar *in vitro* mediante el uso de métodos conocidos de química de proteína sintética, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se
20 pueden construir mediante el uso de una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

En los anticuerpos humanizados recombinantes, la porción Fc γ se puede modificar para evitar la interacción con el receptor Fc γ y el complemento y el sistema
25 inmunitario. Las técnicas para la preparación de tales anticuerpos se describen en WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante se puede manipular genéticamente para asemejarse a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Véase, por ejemplo, Patentes U. S. N.º 5.997.867 y 5.866.692.

La invención abarca modificaciones a los anticuerpos y polipéptidos de la
30 invención que incluyen variantes mostradas en la Tabla 5, que incluyen anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente sus propiedades y variantes que tienen una actividad y/o afinidad potenciadas o disminuidas. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos se puede mutar para obtener un anticuerpo con
35 la afinidad de unión deseada a FLT3. La modificación de polipéptidos es una práctica

habitual en la técnica y no se necesita describir en detalle en la presente. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de forma perjudicial la actividad funcional, o que maduran (potencian) la afinidad del polipéptido por su ligando, o uso de análogos químicos.

Las inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una marca de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N-o C-terminal del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminada y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 5 bajo el encabezado de "sustituciones conservadoras". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "ejemplos de sustituciones" en la Tabla 5, o de acuerdo con lo descrito adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos analizados. En algunas formas de realización, las variantes de sustitución de los anticuerpos proporcionadas en la presente no tienen más de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustitución conservadora en la región VH o VL en comparación con el anticuerpo original de referencia. En algunas formas de realización, las sustituciones no están dentro de una CDR de la región VH o VL.

Tabla 5: Sustituciones de aminoácidos

Residuo original (aminoácido natural)	Sustituciones conservadoras	Ejemplos de sustituciones
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu

Residuo original (aminoácido natural)	Sustituciones conservadoras	Ejemplos de sustituciones
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto polipeptídico en el

5 área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) la masa de la cadena lateral. Los residuos de aminoácidos naturales se dividen en grupos en función de las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) No polar: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 10 (2) Polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Ácido (cargado negativamente): Asp, Glu;
- (4) Básico (cargado positivamente): Lys, Arg;
- (5) Residuos que incluyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromático: Trp, Tyr, Phe, His.

15 Las sustituciones no conservadoras se realizan mediante el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la

20 reticulación aberrante. A la inversa, se pueden añadir enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta completar el rediseño de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o la especificidad de unión. En algunas formas de realización, no se realizan más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservadoras dentro de un dominio de CDR. En otras formas de realización, no se realizan más de una a tres sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro de un dominio CDR. En aún otras formas de realización, el dominio CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, *Chem. Immunol.*, 65:111-128, 1997; Wright y Morrison, *TibTECH* 15:26-32, 1997). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan la función de la proteína (Boyd *et al.*, *Mol. Immunol.*, 32:1311-1318, 1996; Wittwe y Howard, *Biochem.*, 29:4175-4180, 1990) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína, que puede afectar la conformación y presenta una superficie tridimensional de la glicoproteína (Jefferis and Lund, *supra*, Wyss y Wagner, *Current Opin. Biotech.*, 7:409-416, 1996). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glicoproteína dada a ciertas moléculas sobre la base de estructuras de reconocimiento específicas. También se ha informado que la glicosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de β -(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de glucosiltransferasa de GlcNAc bisecante, tenían actividad de ADCC mejorada (Umana *et al.*, *Mature Biotech.* 17:176 - 180, 1999).

La glicosilación de anticuerpos típicamente está unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación Unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente

serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descriptas anteriormente
5 (para sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de, o la sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

El patrón de glicosilación de los anticuerpos también se puede alterar sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran
10 medida de la célula huésped utilizada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo de célula se usa para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, ya que agentes terapéuticos potenciales rara vez son células nativas, se pueden esperar variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, por ejemplo Hse *et al.*, J. Biol. Chem. 272:9062-9070, 1997).

Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, formulación de los medios, densidad del cultivo, oxigenación, pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto varios métodos para alterar el patrón de glicosilación logrado en un organismo huésped particular, que incluye la
15 introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patentes U. S. N.º 5.047.335, 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, se pueden eliminar enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, mediante el uso de endoglicosidasa H (Endo H), N-glucosidasa F, endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3. Además,
20 la célula huésped recombinante se puede modificar genéticamente para que sea defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y otras similares son bien conocidas en la técnica.

Otros métodos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Se pueden usar modificaciones, por ejemplo, para la
30 unión de marcas para inmunoensayo. Los polipéptidos modificados se preparan mediante el uso de procedimientos establecidos en la técnica y se pueden analizar mediante el uso de ensayos convencionales conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los Ejemplos.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han
35

modificado de acuerdo con lo descrito en la Publicación PCT N.º WO 99/58572. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a toda o parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente del complemento significativa, o la destrucción mediada por células de la diana. En algunas formas de realización, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Estos se basan típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios de C_H2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para su uso en terapia de anticuerpos crónica, para evitar reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas a la terapia con anticuerpos convencionales.

La invención incluye formas de realización maduras por afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos madurados por afinidad se pueden producir mediante procedimientos conocidos en la técnica (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783, 1992; Barbas *et al.*, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813, 1994; Schier *et al.*, Gene, 169:147-155, 1995; Yelton *et al.*, J. Immunol., 155:1994-2004, 1995; Jackson *et al.*, J. Immunol., 154(7):3310-9, 1995, Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226:889-896, 1992; y Publicación PCT N.º WO2004/058184).

Los siguientes métodos se pueden usar para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, denominado "mutagénesis de barrido de biblioteca". En general, la mutagénesis de barrido de bibliotecas funciona de la siguiente manera. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se reemplazan con dos o más (tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20) aminoácidos mediante el uso de métodos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas formas de realización, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si dos o más aminoácidos están sustituidos en cada posición). En general, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (de acuerdo con la complejidad de la biblioteca), de cada biblioteca se analizan para determinar la afinidad de unión al polipéptido diana (u otra diana de unión), y se identifican los

candidatos con unión aumentada, igual, disminuida, o sin unión. Los métodos para determinar la afinidad de unión son bien conocidos en la técnica. La afinidad de unión se puede determinar mediante el uso del análisis de resonancia de plasmón de superficie Biacore™, que detecta las diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente 2 veces o más. Biacore™ es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o menos. El análisis que usa resonancia de plasmón de superficie Biacore™ se describe en los Ejemplos, en la presente.

La afinidad de unión se puede determinar mediante el uso de Kinexa Biocensor, ensayos de centelleo de proximidad, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), extinción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia y/o despliegue en levaduras. La afinidad de unión también se puede determinar mediante el uso de un bioensayo adecuado.

En algunas formas de realización, cada posición de aminoácido en una CDR se reemplaza (en algunas formas de realización, una a la vez) con los 20 aminoácidos naturales mediante el uso de métodos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en la presente). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas formas de realización, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros (si los 20 aminoácidos están sustituidos en cada posición).

En algunas formas de realización, la biblioteca para analizar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDR. Por lo tanto, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución en 3, 4, 5 o más posiciones, dichas posiciones se encuentran en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. La sustitución se puede preparar mediante el uso de codones de baja redundancia. Véase, por ejemplo, la Tabla 2 de Balint *et al.*, Gene 137 (1):109-18, 1993.

La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede ser una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3. La CDR puede ser una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR extendida.

Los candidatos con unión mejorada se pueden secuenciar, de este modo se identifica una mutante de sustitución de CDR que da como resultado una afinidad mejorada (también denominada sustitución "mejorada"). Los candidatos que se unen

también se pueden secuenciar, de este modo se identifica una sustitución de CDR que retiene la unión.

Se pueden realizar múltiples rondas de pruebas. Por ejemplo, los candidatos (cada uno comprende una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contiene al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, posición de aminoácido en la CDR en la que un mutante de sustitución mostró una unión mejorada). La preparación y el análisis o selección de esta biblioteca se analizan a continuación.

La mutagénesis de barrido de biblioteca también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en la medida en que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión disminuida o ninguna unión también proporciona información relacionada con la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo de anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR retiene la unión cuando se cambia a los 20 aminoácidos, luego esa posición se identifica como una posición que es poco probable que sea necesaria para la unión al antígeno. Por el contrario, si una posición de CDR retiene la unión en solo un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición que es importante para la función de CDR. Por lo tanto, los métodos de mutagénesis de barrido de biblioteca generan información con respecto a las posiciones en las CDR que se pueden cambiar a muchos aminoácidos diferentes (incluidos los 20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que no se pueden cambiar o que solo se pueden cambiar en unos pocos amino ácidos.

Los candidatos con afinidad mejorada se pueden combinar en una segunda biblioteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición, y puede incluir sustituciones adicionales en esa posición, de acuerdo con la complejidad de la biblioteca que se desea o es permitida mediante el uso del método de detección o selección deseado. Además, si se desea, la posición de aminoácidos adyacentes se puede aleatorizar a al menos dos o más aminoácidos. La aleatorización de aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, que a su vez puede permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. La biblioteca también puede comprender la sustitución en posiciones que no mostraron una afinidad mejorada en la primera ronda de análisis.

La segunda biblioteca se analiza o selecciona para miembros de la biblioteca

con afinidad de unión mejorada y/o alterada utilizando cualquier método conocido en la técnica, que incluye la detección mediante el uso de análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore™, y selección mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica para la selección, que incluyen despliegue en fago, despliegue en levadura y despliegue en ribosomas.

La invención también abarca proteínas de fusión que comprende uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos de esta invención. En una forma de realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena liviana mostrada en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, o 232, y/o al menos 10 aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, o 233. En otras formas de realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena liviana y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región variable de la cadena pesada. En otra forma de realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR. En aún otras formas de realización, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 (CDR3 VH) y/o CDR L3 (CDR3 VL). Para los fines de esta invención, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de aminoácidos a la que no está unido en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Los ejemplos de secuencias heterólogas incluyen, pero no se limitan a, una "marca" tal como una marca FLAG o una marca 6His. Las marcas son bien conocidas en la técnica.

Se puede crear un polipéptido de fusión mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante. Típicamente, las proteínas de fusión de esta invención se obtienen mediante la preparación y expresión de un polinucleótido que las codifica mediante el uso de métodos recombinantes descritos en la presente, aunque también se pueden preparar por otros medios conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, síntesis química.

Esta invención también proporciona composiciones que comprenden

anticuerpos conjugados (por ejemplo, unidos) a un agente que facilita el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Para simplificar, se hará referencia en general a anticuerpos con la comprensión de que estos métodos se aplican a cualquiera de las formas de realización de anticuerpo FLT3 descritas en la presente.

- 5 La conjugación generalmente se refiere a la unión de estos componentes de acuerdo con lo descrito en la presente. La unión (que generalmente fija estos componentes en asociación próxima al menos para la administración) se puede lograr de varias maneras. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo,
- 10 un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos de la invención, y vectores y células huésped que comprende el polinucleótido.

15

Por consiguiente, la invención proporciona polinucleótidos (o composiciones, que incluyen las composiciones farmacéuticas), que comprenden polinucleótidos que codifican alguno de los siguientes: P4F6, P4C7, P3A, P5A3, P9B5, P9F1, P1B4, P1B11, P7H3, P3E10, P1A5, P5F7, P4H11, P15F7, P12B6, P8B6, P14G2, P7F9,

20 P08B06EE, P04A04, P01A05, P08B03, P5F7, P5F7g, P10A02g, P10A04g, P10A05g, P10A07g, P10B03g, P10B06g, P5F7g2, P5F7g3, P5F7g4, o cualquiera fragmento o parte de estos que tienen la capacidad de unirse a FLT3.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (que incluyen fragmentos de anticuerpo) y polipéptidos descritos en la presente, tales como anticuerpos y polipéptidos que tienen la función efectora alterada. Los polinucleótidos se puede obtener y expresar mediante procedimientos conocidos en la técnica.

25

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas formas de realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

30

Los vectores de expresión y la administración de las composiciones de polinucleótido también se describen en la presente.

35

En otro aspecto, la invención proporciona un método de preparación de cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente.

Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias también están abarcados por la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser de cadena simple (codificadores o antisentido) o cadena doble, y pueden ser moléculas de ADN (genómicas, de ADNc o sintéticas) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de una manera uno a uno, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Pueden estar presentes, aunque no necesariamente, secuencias codificadoras o no codificadoras adicionales dentro de un polinucleótido de la presente invención, y un polinucleótido puede estar unido, aunque no necesariamente, a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción del mismo) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de manera que la inmunorreactividad del polipéptido codificado no disminuye, con respecto a una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado generalmente se puede evaluar de acuerdo con lo descrito en la presente. Las variantes con preferencia exhiben al menos aproximadamente 70 % de identidad, con más preferencia, al menos aproximadamente 80 % de identidad, aún con más preferencia, al menos aproximadamente 90 % de identidad, y con máxima preferencia, al menos aproximadamente 95 % de identidad con una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima de acuerdo con lo descrito a continuación. Las comparaciones entre dos secuencias se realizan típicamente por comparación de las secuencias en una ventana de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se usa en la presente, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, usualmente de 30 a aproximadamente 75, o de 40 a aproximadamente 50, en que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de forma óptima.

La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar mediante el uso del programa Megalign en el paquete de software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), mediante el uso de parámetros predeterminados. Este programa incorpora varios esquemas de alineación descriptas en las siguientes referencias: Dayhoff, M. O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence y Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles y Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Con preferencia, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, brechas) de 20 por ciento o menos, habitualmente de 5 a 15 por ciento, o de 10 a 12 por ciento, en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que se encuentran bases de ácido nucleico o residuos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, se divide el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y multiplican los resultados por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes también pueden, o alternativamente, ser sustancialmente homólogas a un gen nativo, o una porción o complemento del mismo. Dichas variantes de polinucleótidos son capaces de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las "condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavado en una solución de 5 X SSC, SDS 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 °C-65

°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido de un lavado dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene 0,1% de SDS.

Como se usa en la presente, "condiciones muy rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio 0,1 % a 50 °C; (2) emplear durante la hibridación un agente desnaturalizante, como formamida, por ejemplo, formamida 50 % (v/v) con albúmina sérica bovina 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/tampón de polivinilpirrolidona 0,1 %/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplear formamida 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/mL), SDS 0,1 % y sulfato de dextrano 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Los expertos en la técnica apreciarán que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido descrito en la presente. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones están contemplados específicamente por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como supresiones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alterada. Los alelos se pueden identificar mediante el uso de técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencia de base de datos).

Los polinucleótidos de esta invención se pueden obtener mediante el uso de síntesis química, métodos recombinantes o PCR. Los métodos de síntesis de polinucleótidos químicos son bien conocidos en la técnica y no necesitan describirse en detalle en la presente. Un experto en la técnica puede usar las secuencias proporcionadas en la presente y un sintetizador de ADN comercial para producir una

secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos mediante el uso de métodos recombinantes, se puede insertar un polinucleótido que comprende una secuencia deseada en un vector adecuado, y el vector, a su vez, se puede introducir en una célula huésped adecuada para replicación y amplificación, de acuerdo con lo descrito adicionalmente en la presente. Los polinucleótidos se pueden insertar en las células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman mediante la introducción de un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno se puede mantener dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido así amplificado se puede aislar de la célula huésped mediante métodos bien conocidos dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989.

Alternativamente, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR es bien conocida en la técnica y se describe en las patentes U. S. N.º. 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como en PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.* eds., Birkhäuser Press, Boston, 1994.

El ARN se puede obtener mediante el uso del ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN luego se puede aislar mediante el uso de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, como se expone por ejemplo en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

Los vectores de clonación adecuados se pueden construir de acuerdo con técnicas estándares, o se pueden seleccionar a partir de una gran cantidad de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se desea usar, los vectores de clonación útiles generalmente tendrán la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer una única diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden llevar genes para un marcador que se puede usar para seleccionar clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son constructos de polinucleótidos

replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Esto implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores virales que incluyen adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y vectores de expresión descritos en la Publicación PCT N.º WO 87/04462. Los componentes del vector generalmente pueden incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcional adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción), normalmente se requieren uno o más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de inicio de traducción y codones de detención.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés se pueden introducir en la célula huésped por cualquiera de varios medios apropiados, que incluyen electroporación, transfección que emplea cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso tal como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula huésped.

La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos se puede usar con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitación, células COS, HeLa y CHO. Véase también la Publicación PCT N.º WO 87/04462. Las células huésped no mamíferas adecuadas incluyen procariotas (tales como E. coli o B. subtilis) y levaduras (tales como S. cerevisiae, S. pombe o K. lactis). Con preferencia, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces mayor, con más preferencia, 10 veces mayor, incluso con más preferencia, 20 veces mayor que el del anticuerpo o proteína endógena de interés correspondiente, si está presente, en las células huésped. El análisis de las células huésped para una unión específica a FLT3 se efectúa mediante un inmunoensayo o FACS. Se puede identificar una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés.

Métodos de uso de los anticuerpos FLT3

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones

que incluyen, pero sin limitación, métodos de tratamiento terapéutico y métodos de tratamiento de diagnóstico.

- Los anticuerpos (por ejemplo, monoespecíficos y biespecíficos) obtenidos por los métodos descritos anteriormente se pueden usar como un medicamento. En algunas formas de realización, dicho medicamento se puede usar para tratar el cáncer. En algunas formas de realización, el cáncer es un cáncer de origen hematopoyético, tal como un linfoma o leucemia. En algunas formas de realización, el cáncer es mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin predominante en linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma no Hodgkin de células B (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma B-linfoblástico precursor, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma del tejido linfático asociado a la mucosa, linfoma linfocítica de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes del mediastino primario (timo), linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma difuso cutáneo primario de células B grandes (tipo de pierna), linfoma difuso de células B grandes EBV positivo de edad avanzada, linfoma difuso de células B grandes asociado con inflamación, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes ALK positivo, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico y otro cáncer relacionado con células hematopoyéticas. En una forma de realización preferida el cáncer es AML. En una forma de realización preferida el cáncer es ALL.
- En algunas formas de realización, se proporciona un método de inhibición de

crecimiento o progresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan FLT3, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, FLT3-CD3 anticuerpos biespecíficos) de acuerdo con lo descrito en la presente. En otras formas de realización, se proporciona un método de inhibición de metástasis de células que expresan FLT3 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, FLT3-CD3 anticuerpos biespecíficos) de acuerdo con lo descrito en la presente. En otras formas de realización, se proporciona un método para inducir la regresión del tumor en las células malignas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, FLT3-CD3 anticuerpos biespecíficos) de acuerdo con lo descrito en la presente.

En algunas formas de realización, el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo biespecífico FLT3-CD3) de acuerdo con la invención se puede usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un paciente que lo necesita.

En algunas formas de realización, el tratamiento puede estar en combinación con una o más terapias contra un cáncer seleccionado del grupo que consiste en terapia de anticuerpos, quimioterapia, terapia de citoquinas, terapia dirigida, terapia de vacunas, terapia de células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, resección quirúrgica, terapia con luz láser y radioterapia.

En algunas formas de realización, la citoquina usada en la terapia de citoquina es interleuquina (IL)- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17. En algunas formas de realización, la citoquina es IL-15, IL-12, o IL-2. Por ejemplo, los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos FLT3-CD3) de la presente invención se administran a un paciente en conjunto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) con una IL-15 tipo salvaje (por ejemplo, número de acceso: >sp|P40933|49-162 o SEQ ID NO: 293).

En algunas formas de realización, los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos FLT3-CD3) de la presente invención se administran a un paciente junto con el tratamiento (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) con un agente bioterapéutico, por ejemplo, un anticuerpo, que incluye pero sin limitación, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-41BB (por ejemplo, PF-04518600), un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab, o PF-06801591), un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, avelumab, atezolizumab, o durvalumab), un

anticuerpo anti-TIM3, un anticuerpo anti-LAG3, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo IL-8, un anticuerpo anti-HVEM, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-CD40, un anticuerpo anti-CD40L, anticuerpo anti-CD47, un anticuerpo anti-CSF1R, un anticuerpo anti-CSF1, un anticuerpo anti-MARCO, un anticuerpo anti-
5 CXCR4, anticuerpo anti-VEGFR1, un anticuerpo anti-VEGFR2, un anticuerpo anti-TNFR1, un anticuerpo anti-MCSF (por ejemplo, PD-0360324), un anticuerpo anti-TNFR2, un anticuerpo biespecífico anti-CD3, un anticuerpo anti-CD19, un anti-CD20, un anticuerpo anti-Her2, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-ICOS, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD 52, un anticuerpo anti-CCR4, un
10 anticuerpo anti-CCR8, un anticuerpo anti-CD200R, un anticuerpo anti-VISG4, un anticuerpo anti-CCR2, un anticuerpo anti-LILRb2, un anticuerpo anti-CXCR4, un anticuerpo anti-CD206, un anticuerpo anti-CD163, un anticuerpo anti-KLRG1, un anticuerpo anti-B7-H4, un anticuerpo anti-B7-H3 o un anticuerpo anti-GITR.

En algunas formas de realización, los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos FLT3-CD3) de la presente invención se administran a un
15 paciente junto con el tratamiento (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) con un antagonista de CCR2 (por ejemplo, INC-8761), un agente antiviral, cidofovir e interleuquina-2, citarabina (también conocida como ARA-C) o tratamiento con natalizimab para pacientes con MS o tratamiento con efaliztimab para pacientes con
20 psoriasis u otros tratamientos para pacientes con PML. En algunas formas de realización, los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos FLT3-CD3) de la presente invención se pueden usar en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores (tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506) u otros agentes immunoablativos tales como CAMPATH, citotoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas y/o irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa de calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). En formas de realización adicionales, los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos FLT3-CD3) de la presente invención se pueden usar en
30 combinación con inhibidores de quinasas, que incluyen, pero sin limitación, inhibidores de mTOR, midostaurina, lestaurtinib, sorafenib, sunitinib, quizartinib, ponatinib, crenolanib, palbociclib y gilteritinib.

En algunas formas de realización, los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos FLT3-CD3) de la presente invención también se pueden usar
35

en combinación con moduladores epigenéticos, inhibidores de proteasoma, agentes inmunomoduladores (por ejemplo, lenalidomida), inhibidores de Hedgehog, TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). Inhibidores de PAP (fosfatasa de ácido fosfatídico), virus oncolíticos, inhibidores de IDO (Indolamino-Pirrol 2,3-dioxigenasa), inhibidores de glutaminasa GLS1, vacunas de tumores, agonistas de TLR (receptores tipo Toll) (por ejemplo, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, o TLR9), o inhibidores de la isocitrato deshidrogenasa (IDH).

En una forma de realización adicional, los anticuerpos FLT3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos FLT3-CD3) de la presente invención se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) el trasplante de médula ósea, células CART (receptor de antígeno quimérico T), terapia ablativa de células T mediante el uso de agentes de quimioterapia como fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos tales como OKT3 o alemtuzumab.

La administración de los anticuerpos (por ejemplo, monoespecíficos o biespecíficos) de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, que incluye inhalación en aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intracraneal, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática, o por vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones de anticuerpos de la invención se administran con preferencia por inyección intravenosa.

En algunas formas de realización, la administración de los anticuerpos (por ejemplo, monoespecíficos o biespecíficos) puede comprender la administración de, por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal que incluye todos los valores enteros de mg por kg dentro de estos intervalos. En algunas formas de realización, la administración de los anticuerpos puede comprender la administración de aproximadamente 0,1 a 10 mg por kg de peso corporal que incluye todos los valores enteros de mg por kg dentro de estos intervalos. El anticuerpo se puede administrar en una o más dosis. En algunas formas de realización, dicha cantidad efectiva del anticuerpo se puede administrar como una dosis única. En algunas formas de realización, dicha cantidad efectiva de anticuerpos se puede administrar como más de una dosis durante un período de tiempo. El tiempo de administración está dentro del criterio del médico tratante y depende del estado clínico del paciente. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos de cantidades efectivas de un anticuerpo dado (por ejemplo,

monoespecífico o biespecífico) para una enfermedad o afección particular dentro de la experiencia en la técnica. Una cantidad efectiva significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si existe, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. En algunas formas de realización, una cantidad efectiva de anticuerpo heteromultimérico o composición que comprende esos anticuerpos se administran por vía parenteral. En algunas formas de realización, la administración puede ser una administración intravenosa. En algunas formas de realización, la administración se puede realizar directamente mediante inyección dentro de un tumor.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-FLT3 proporcionados en la presente se pueden usar con fines de diagnóstico, tales como ensayos para identificar proteína FLT3 en muestras (por ejemplo, en ensayos de inmunohistoquímica) o en pacientes.

Composiciones

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo (por ejemplo, monoespecífico o biespecífico) de la invención o una porción del mismo como se describió anteriormente en un portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas formas de realización, los polipéptidos de la invención pueden estar presentes en una forma neutra (que incluye formas zwitteriónicas) o como una especie cargada positiva o negativamente. En algunas formas de realización, los polipéptidos se pueden complejar con un contraión para formar una "sal farmacéuticamente aceptable", que se refiere a un complejo que comprende uno o más polipéptidos y uno o más contraiones, donde los contraiones se derivan de ácidos y bases orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables.

El anticuerpo (por ejemplo, monoespecífico o biespecífico) o porciones del mismo, se pueden administrar solos o en combinación con uno o más de otros polipéptidos de la invención o en combinación con uno o más fármacos diferentes (o como cualquier combinación de los mismos). Las composiciones farmacéuticas, métodos y usos de la invención también abarcan formas de realización de combinaciones (coadministración) con otros agentes activos, como se detalla a continuación.

Como se usa en la presente, los términos "coadministración", "coadministrado" y "en combinación con", que se refieren a los anticuerpos de la invención y uno o más agentes terapéuticos diferentes, significan, se refieren a e incluyen lo siguiente: (i) la

administración simultánea de tal combinación de un anticuerpo descrito en la presente y agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosis única que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo a dicho paciente; (ii) la administración

5 sustancialmente simultánea de dicha combinación de un anticuerpo descrito en la presente y agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados entre sí en formas de dosis separadas que son tomadas sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, con lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente;

10 (iii) la administración secuencial de tal combinación de un anticuerpo descrito en la presente y agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados entre sí en formas de dosis separadas que son tomadas en momentos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, después de lo cual dichos componentes

15 se liberan en momentos sustancialmente diferentes en dicho paciente; y (iv) la administración secuencial de tal combinación de un anticuerpo descrito en la presente y agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosis única que libera dichos componentes de forma controlada después de lo cual se liberan al mismo tiempo, consecutivamente, y/o superpuesto en el mismo y/o diferentes momentos a dicho

20 paciente, donde cada parte se puede administrar por la misma vía o una diferente.

Generalmente, el anticuerpo (por ejemplo, monoespecífico o biespecífico) descrito en la presente o porciones del mismo son adecuados para administrarse como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente

25 aceptables. El término "excipiente" se usa en la presente para describir cualquier ingrediente distinto de los compuestos de la invención. La elección de los excipientes dependerá en gran medida de factores tales como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosis. Como se usa en la presente, el "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de

30 dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol

35 y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible

incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia del anticuerpo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Tales composiciones y métodos para su preparación se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19.º Edición (Mack Publishing Company, 1995). Las composiciones farmacéuticas con preferencia se fabrican en condiciones GMP.

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o vender a granel, como una única dosis unitaria, o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se usa en la presente, una "dosis unitaria" es una cantidad diferenciada de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosis del ingrediente activo que se puede administrar a un sujeto o una fracción conveniente de tal dosis tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis. Cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos aceptado en la técnica se puede emplear de manera adecuada para las proteínas heterodiméricas y porciones de las mismas descritas en la presente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son típicamente adecuadas para administración parenteral. Como se usa en la presente, "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por ruptura física de un tejido de un sujeto y administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido, lo que generalmente produce la administración directa en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. La administración parenteral incluye de este modo, pero sin limitación, la administración de una composición farmacéutica por inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero sin limitación, inyección o infusiones subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intracraneal, intrasinovial; y técnicas de infusión de diálisis renal. Las formas de

realización preferidas incluyen las vías intravenosa y subcutánea.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral generalmente de forma típica comprenden el ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasar o vender en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o vender en forma de dosis unitaria, tal como en ampollas o en recipientes de dosis múltiples que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas y similares. Dichas formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una forma de realización de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir, polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógeno) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponantes (con preferencia a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular más adecuadamente como una solución estéril no acuosa o como una forma seca para ser utilizada en conjunto con un vehículo adecuado tal como agua estéril, libre de pirógenos. Los ejemplos de formas de administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Dichas formas de dosis se pueden tamponar adecuadamente, si se desea. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, o en una preparación liposómica. Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen formulaciones de liberación controlada, retardada, sostenida, pulsada, dirigida y programada. Por ejemplo, en un aspecto, se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de la proteína heterodimérica, por ejemplo, anticuerpo biespecífico, en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general,

las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede conseguir mediante la inclusión en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para la facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosis, como se usa en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los pacientes/sujetos para tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosis de la invención generalmente está dictada por y depende directamente de a) las características únicas del agente quimioterapéutico y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se debe lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Por lo tanto, el profesional experto puede apreciar, sobre la base de la descripción proporcionada en la presente, que la dosis y el régimen de dosificación se ajustan de acuerdo con métodos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, la dosis máxima tolerable se puede establecer fácilmente, y la cantidad efectiva que proporciona un beneficio terapéutico detectable para un paciente también se puede determinar, al igual que los requerimientos temporales para administrar cada agente para proporcionar un beneficio terapéutico detectable para el paciente. Por

consiguiente, aunque ciertos regímenes de dosis y administración se ejemplifican en la presente, estos ejemplos de ninguna manera limitan la dosis y el régimen de administración que se pueden proporcionar a un paciente en la práctica de la presente invención.

5 Cabe señalar que los valores de dosis pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se va a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. También se debe entender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la
10 administración de las composiciones, y que los intervalos de dosis establecidos en la presente solo son a modo de ejemplo y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de esta invención se puede basar en una variedad de factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, el estado médico del
15 paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración, y el anticuerpo particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero se puede determinar de forma rutinaria mediante el uso de métodos estándares. Por ejemplo, las dosis se pueden ajustar en función de parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos, tales como efectos tóxicos y/o
20 valores de laboratorio. Por lo tanto, la presente invención abarca el escalado de dosis intrapaciente según lo determine el profesional experto. La determinación de las dosis y regímenes apropiados es bien conocida en la técnica relevante y se puede entender que está abarcada por el profesional experto en la técnica una vez que se proporcionan las enseñanzas descriptas en la presente.

25 En general, para la administración de los anticuerpos descritos en la presente (monoespecíficos o biespecíficos), la dosis candidata se puede administrar diariamente, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas, cada ocho semanas, cada diez semanas, cada doce semanas o más de cada doce semanas.
30 Para administraciones repetidas durante varios días o más, de acuerdo con la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para reducir los síntomas asociados con el cáncer. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de
35 dosificación (que incluye el anticuerpo anti-FLT monoespecífico o biespecífico

utilizado) puede variar a lo largo del tiempo.

En algunas formas de realización, la dosis candidata se administra en forma diaria con la dosis que varía de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, y aproximadamente 25 mg/kg.

En algunas formas de realización, la dosis candidata se administra cada semana con la dosis que varía de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis semanal de aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, y aproximadamente 30 mg/kg.

En algunas formas de realización, la dosis candidata se administra cada dos semanas con la dosis que varía de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis bisemanal de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, y aproximadamente 30 mg/kg.

En algunas formas de realización, la dosis candidata se administra cada tres semanas con la dosis que varía de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis tri-semanal de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, y aproximadamente 50 mg/kg.

En algunas formas de realización, la dosis candidata se administra cada mes o cada cuatro semanas con la dosis que varía de aproximadamente cualquiera de 1 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg, a 100 mg/kg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis mensual de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, y aproximadamente 50 mg/kg.

En otras formas de realización, la dosis candidata se administra en forma diaria con la dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1200 mg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, o aproximadamente 1200.

En otras formas de realización, la dosis candidata se administra cada semana con la dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2000 mg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis semanal de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1900 mg, o aproximadamente 2000 mg.

En otras formas de realización, la dosis candidata se administra cada dos semanas con la dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2000 mg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis bisemanal de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente

0,1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, 5 aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1900 mg, o aproximadamente 2000 mg.

En otras formas de realización, la dosis candidata se administra cada tres 10 semanas con la dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2500 mg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis trisemanal de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, 15 aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, 20 aproximadamente 1900 mg, aproximadamente 2000 mg, aproximadamente 2100 mg, aproximadamente 2200 mg, aproximadamente 2300 mg, aproximadamente 2400 mg, o aproximadamente 2500.

En otras formas de realización, la dosis candidata se administra cada cuatro 25 semanas o un mes con la dosis que varía de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 3000 mg o más, de acuerdo con los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, se puede usar una dosis mensual de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 500 mg, 30 aproximadamente 600 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 1100 mg, aproximadamente 1200 mg, aproximadamente 1300 mg, aproximadamente 1400 mg, aproximadamente 1500 mg, aproximadamente 1600 mg, aproximadamente 1700 mg, aproximadamente 1800 mg, aproximadamente 1900 mg, aproximadamente 2000 mg, 35 aproximadamente 2100 mg, aproximadamente 2200 mg, aproximadamente 2300 mg,

aproximadamente 2400 mg, aproximadamente 2500, aproximadamente 2600 mg, aproximadamente 2700 mg, aproximadamente 2800 mg, aproximadamente 2900 mg, o aproximadamente 3000 mg.

Kits

5 La invención también proporciona kits para uso en los métodos presentes. Los kits de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden el anticuerpo (por ejemplo, monoespecífico o biespecífico) de acuerdo con lo descrito en la presente y las instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descritos en la presente. En general, estas instrucciones comprenden una descripción
10 de la administración de la proteína de anticuerpo para los tratamientos terapéuticos descritos anteriormente.

 Las instrucciones relacionadas con el uso del anticuerpo (por ejemplo, monoespecífico o biespecífico) de acuerdo con lo descrito en este documento generalmente incluyen información en cuanto a la dosis, esquema de dosificación y la
15 vía de administración para el tratamiento deseado. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases de dosis múltiples) o dosis de subunidades. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero las instrucciones legibles por máquina (por ejemplo,
20 instrucciones llevadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico) son también aceptables.

 Los kits de esta invención están en un envase adecuado. El envasado adecuado incluye, pero sin limitación, viales, frascos, jarras, envases flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o de plástico selladas) y similares. También se contemplan
25 envases para usar en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El
30 recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo biespecífico. El recipiente puede comprender adicionalmente un segundo agente farmacéuticamente activo.

35 Los kits opcionalmente pueden proporcionar componentes adicionales tales

como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto o asociado con el recipiente.

Depósito biológico

Los materiales representativos de la presente invención se depositaron en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE. UU., el 1 de junio de 2017. El vector P5F7g2-VL que tiene el número de acceso ATCC PTA-124230 es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena liviana P5F7g2, y el vector P5F7g2-VH que tiene el número de acceso ATCC PTA-124229 es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena pesada P5F7g2. Los depósitos se realizaron según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations [Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento y Regulaciones en materia de Patentes] (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito será puesto a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Pfizer, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente e irrestricta de la progenie del cultivo del depósito al público después de la emisión de la patente U. S. pertinente o después de abrir al público cualquier solicitud de patente U. S. o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos de América para tener derecho a ello en virtud de 35 USC § 122 y las reglas del Comisionado en virtud de la misma (que incluye 37 C.F.R. § 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales serán reemplazados inmediatamente después de la notificación con otro del mismo. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

También se hace referencia a un material descrito en la presente y depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE. UU., el 1 de junio de 2017. El vector PE310-VL, que tiene el N.º de acceso a ATCC PTA-124228, es un polinucleótido que codifica la región variable de

cadena liviana de PE310, y el vector P3E10-VH, que tiene el N.º de acceso a ATCC PTA-124227, es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada de PE310. Los depósitos también se realizaron conforme a las disposiciones del tratado de Budapest, de acuerdo con los términos y condiciones de este, que se resumieron
5 anteriormente.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. En efecto, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y
10 caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Determinación de cinética y afinidad de interacciones de FLT3/anticuerpos FLT3 humanos a 37 °C

Este ejemplo determina la cinética y la afinidad de diversos anticuerpos anti-FLT3 a 37 °C. Todos los experimentos se realizaron en un biosensor de resonancia de plasmón superficial Biacore T200 (GE Lifesciences, Piscataway NJ).
15

La preparación del chip sensor se realizó a 25 °C con un tampón de ejecución de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05 % (v/v), pH 7,4. Se realizó un chip sensor Fc antihumano mediante la activación de todas las celdas de flujo de un chip sensor Biacore CM4 con una mezcla 1:1 (v/v) de EDC 400 mM y NHS 100 mM durante
20 7 minutos, a un caudal de flujo de 10 µL/min. Se diluyó un reactivo Fc antihumano (anti-Fc IgG humana de cabra, Southern Biotech Catalog # 2081-01) a 30 µg/mL en acetato de sodio 10 mM pH 4,5 y se inyectó en todas las celdas de flujo durante 7 minutos a 20 µL/min. Todas las celdas de flujo se bloquearon con 100 mM de
25 etilendiamina en tampón de borato 150 mM pH 8,5 durante 7 minutos a 10 µL/min.

Los experimentos se realizaron a 37 °C mediante el uso de un tampón de ejecución de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05 % (v/v), pH 7,4, BSA 1 mg/mL. Los anticuerpos FLT3 se capturaron de los sobrenadantes no diluidos en las celdas de flujo corriente abajo (celdas de flujo 2, 3 y 4) a un caudal de flujo de 10
30 µL/min durante 1 minuto. Se capturaron diferentes anticuerpos en cada celda de flujo. La celda de flujo 1 se usó como superficie de referencia. Después de la captura de los anticuerpos FLT3, se inyectó analito (tampón, hFLT3) a 30 µL/min en todas las celdas de flujo durante dos minutos. Después de la inyección del analito, se controló la disociación durante 10 minutos seguido de la regeneración de todas las celdas de flujo
35 con tres inyecciones de 1 minuto de ácido fosfórico 75 mM. Para cada anticuerpo

FLT3 capturado, se realizaron las siguientes inyecciones de analito: tampón, hFLT3 11 nM, hFLT3 33 nM, hFLT3 100 nM y hFLT3 300 nM. Se recolectaron ciclos de tampón para cada anticuerpo FLT3 capturado con fines de doble referencia (doble referencia de acuerdo con lo descrito en Myszk, D. G. Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit*, **12**, 279-284 (1999)). Los sensogramas de doble referencia se ajustaron globalmente a un simple modelo de unión de *Langmuir 1:1 con transporte de masa*.

Los parámetros de cinética y afinidad para los anticuerpos anti-FLT3 analizados se muestran en las Tablas 6

Tabla 6

	dominio	Formato IgG					Formato scFv			
		k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (min)	huFlt3 mFlt3		k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (min)	K _D (nM)
					K _D (nM)	K _d (nM)				
P4F6	1	1,40E+05	3,50E-03	3,3	25	36,1	1,32E+05	1,99E-03	5,8	15,1
P4C7	1	1,60E+05	1,20E-03	9,3	7,7	402,4	1,21E+05	1,64E-03	7	13,6
P3A1	2	9,50E+04	6,00E-03	1,9	64	-	1,07E+05	1,67E-03	6,9	15,67
P5A3	3	9,80E+04	1,00E-02	1,2	102	19,3	8,10E+04	1,75E-02	0,7	216
P9B5	3	4,20E+04	4,70E-04	24,4	11	1,5	3,80E+04	6,87E-04	16,8	18,1
P9F1	3	1,80E+05	2,30E-02	0,5	127	-	2,26E+05	2,86E-02	0,4	126,5
P1B4	4	1,80E+05	5,80E-03	2	32	-	1,20E+05	3,27E-03	3,5	27,3
P1B11	4	1,20E+05	5,50E-03	2,1	45	-	8,47E+04	2,57E-03	4,5	30,3
P7H3	4	9,90E+05	1,80E-03	6,6	2	0,9	2,05E+05	1,87E-03	6,2	9,1
P3E10	4	1,80E+05	1,90E-02	0,6	106	-	1,72E+05	1,12E-02	1	65,1
P1A5	4	1,78E+06	3,47E-04	33	0,19	-	2,59E+05	2,92E-04	40	1,1
P4A4	4	1,16E+06	4,69E-04	25	0,4	-				
P1G12	4	6,17E+05	2,92E-04	40	0,47	6,5				
P4E5	4	1,20E+06	1,51E-04	77	0,13	18,9				
P5A4	4	5,53E+05	1,01E-04	114	0,18	-				
P5F7	4	6,36E+05	1,52E-04	76	0,24	-	1,89E+05	1,97E-04	59	1
P4H11	4	6,18E+04	1,44E-02	1	233	-	1,60E+05	9,33E-03	1	58,3
P15F7	5	1,40E+05	5,50E-03	2,1	38	-				
P12B6	5	1,10E+05	9,00E-03	1,3	84	-				
P7D3	5	7,10E+04	5,20E-03	2,2	72	-				
P7A6	5	3,40E+04	3,70E-04	31	11					
P8B6	5	9,30E+04	2,30E-04	51	2,5	-				
P14G2	5	1,40E+05	1,10E-03	10,7	8	-	9,35E+04	3,05E-04	37,9	3,3
P7F9	4	1,10E+05	1,30E-03	8,9	12	13,8	8,70E+04	2,41E-03	4,8	27,7

Ejemplo 2: Destrucción mediada por células T de las líneas celulares de AML mediante el uso de IgG biespecífico Flt3-CD3 dirigido al dominio 4 *in vitro*

Este ejemplo ilustra la citotoxicidad *in vitro* de Anti-Flt3/CD3 hIgG2ΔA_D265A Biespecífico en células Flt3 Positiva.

Los anticuerpos anti-Flt3 humanos (P5F7p, P5F7g2, P5F7g2, P5F7g3, P5F7g4) y anti-CD3 humanos (h2B4-VH-hnps VL-TK ("H2B4")) se expresaron como IgG2ΔA_D265A humana manipulada genéticamente con EEEE en una rama y RRRR en la otra rama para el intercambio biespecífico en las posiciones 223, 225, y 228 (por

ejemplo, (C223E o C223R), (E225E o E225R), y (P228E o P228R)) en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (por ejemplo, K409R o L368E (esquema de numeración EU)) en la región CH3 de IgG2 humana (SEQ ID NO: 236). El anticuerpo biespecífico FLT3/CD3 también tiene la mutación de D a A en la posición 265 (esquema de numeración EU).

Las células T CD3⁺ de PBMC humanas se seleccionaron negativamente mediante el uso del kit de aislamiento de células T Pan, humano (Miltenyi, San Diego CA). Las células que expresan la diana (Eol1) y las células T CD3⁺ se sembraron en placas transparentes con fondo en U a razón de 20000 y 100000 células/pocillo, respectivamente. Las células se trataron con anticuerpo biespecífico diluido en serie 8 veces. La reducción de células AML se determinó por análisis de citometría de flujo 24 horas después del tratamiento. La reducción celular se midió por contraste con las células tratadas de control, en este caso H2B4 solo en la Figura 1. Se calculó EC50 mediante el software Prism. Se observó cito toxicidad en esta línea de células Eol1 como se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 3: IgG Flt3-CD3 biespecífico induce la ablación del tumor en modelo de xenoinjerto ortotópico AML.

Este ejemplo ilustra la regresión e inhibición del tumor en un modelo de xenoinjerto de Eol1 ortotópico.

El estudio de eficacia *in vivo* de Flt3 biespecíficos se realizó con Eol1, que expresa luciferasa y GFP, modelo ortotópico. Se inyectaron trescientas mil células Eol1 LucGFP por vía intravenosa a través de la vena de la cola en animales Nod/Scid/IL2Rg^{-/-} (NSG) hembra de 6-8 semanas. La inyección intraperitoneal de D-luciferina (Regis Technologies, Morton Grove, IL) (200 uL por animal a 15 mg/mL), seguida de anestesia con isoflurano y la posterior obtención de imágenes de bioluminiscencia corporal total (BLI) permitieron controlar la carga tumoral. Las señales bioluminiscentes emitidas por la interacción entre la luciferasa expresada por las células tumorales y luciferina se capturaron mediante imágenes mediante el uso de un espectro IVIS CT (Perkin Elmer, MA) y cuantificaron como flujo total (fotones/seg) mediante el uso de Living Image 4.4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA). Cuando el flujo total alcanzó un promedio de 15E6 para todos los animales, los animales se inyectaron en bolo a través de la vena de la cola con 20 millones de células T expandidas de PBMC. Brevemente, las células pan-T adquiridas de AllCells (Alameda, CA) se activaron con el kit de activación/expansión de células T humanas (Miltenyi,

San Diego, CA). Después de tres días, se añadieron 20 ng/mL de IL2 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) cada dos días hasta el día 11. Se recolectaron las células, las perlas de activación/expansión se eliminaron magnéticamente, y las células se lavaron y se resuspendieron en PBS. Dos días después de la inyección de células T, se obtuvieron imágenes de los ratones como se describió anteriormente y los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de siete ratones: P1A5 10 µg/kg (ug/kg), P4A4 10upk, P4E5 10upk, P5F7 10upk, P5F7 30upk y Stumpy (CD3 de unión solo control biespecífico a 30 µg/kg). Tres días después del implante de células T, una dosis única de anticuerpo anti-Flt3/CD3 humano (FLT3 como se indicó anteriormente en una rama) y el anticuerpo CD3 (h2B4-VH-hnps VL-TK) en otra rama) biespecífico y el control del anticuerpo biespecífico negativo (NNC) se administró mediante inyección en bolo en la vena de la cola. Los animales se sacrificaron cuando exhibieron parálisis de las patas traseras, un criterio de valoración para el modelo ortotópico de AML. La Figura 2 muestra que una única dosis de anticuerpo biespecífico anti-Flt3/CD3 humano dio como resultado la regresión tumoral de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 4: Las IgG de Flt3-CD3 biespecífico que se dirige al dominio 4 son más potentes en comparación con anticuerpos bispecíficos dirigidos al dominio 5 en un modelo ortotópico de AML.

Este ejemplo ilustra la actividad tumoral mejorada de los anticuerpos dirigidos al dominio 4 de Flt3 en comparación con los anticuerpos dirigidos al dominio 5.

El modelo de xenoinjerto ortotópico Eol1 se realizó de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 3. En este caso, se dosificó un anticuerpo biespecífico 6B7 dirigido al dominio 4 o un anticuerpo biespecífico P8B6 dirigido al dominio 5 a una dosis única de 10upk. Stumpy representa el anticuerpo biespecífico de control que solo se une a CD3. En la dosis analizada, P8B6 no tenía actividad antitumoral, mientras que 6B7 era ablativo tumoral.

Ejemplo 5: Los valores de EC50 para el anticuerpo biespecífico Flt3 se reducen significativamente en la presencia de IL15 en un ensayo de destrucción *in vitro* a largo plazo

Este ejemplo ilustra la citotoxicidad *in vitro* del anticuerpo biespecífico anti-Flt3/CD3 P3F7 en células Flt3 positiva en combinación con IL-15.

Los linfocitos Pan T humanos previamente congelados se descongelaron y

recuperaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero 10 % (Hyclone), Pen Strep 1 % (Corning) y 15 unidades por mL de IL-2 humana (eBioscience) durante un día. Se recogieron linfocitos T humanos recuperados durante 1 día y se resuspendieron en 1×10^6 células/mL en medio RPMI completo. Se sembraron células EOL1 que expresan Flt3 a razón de 50.000 células en 100 μ L en una placa con fondo en U de 96 pocillos. Cincuenta mil (50,000) linfocitos CD3+ humanos viables se añadieron a las células tumorales sembradas en 25 μ L de medio por pocillo. Se prepararon diluciones seriadas 5 veces de 5 puntos del anticuerpo biespecífico Flt3/CD3 P5F7 (intervalo de dosis 1×10^{-11} nM a 8×10^{-14} nM de concentración final). El ensayo de citotoxicidad se inició mediante la adición de anticuerpo biespecífico diluido a las placas e incubación a 37 °C durante 2 días, 5 días o 7 días. Para evaluar el efecto de IL15 sobre la eficacia antitumoral de las células T redireccionadas con anticuerpos biespecíficos de Flt3/CD3, los cultivos celulares recibieron 10 ng/mL de IL15 o control del vehículo. La reducción de células AML se determinó por análisis de luciferasa en los puntos de tiempo respectivos. Luego se determinaron los valores de EC50 mediante el gráfico de regresión no lineal del porcentaje de citotoxicidad específica versus la concentración Log10 de Flt3/CD3 P5F7 biespecífico mediante el uso del software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software). La Figura 4A y la Figura 4B ilustran la actividad antitumoral mejorada del anticuerpo biespecífico Flt3/CD3 en ausencia o presencia de IL15 en un ensayo de destrucción a largo plazo, respectivamente.

Ejemplo 6: Las células T autólogas presentes en los aspirados de médula ósea de pacientes con AML son efectivos en la destrucción de blastos de AML en presencia de anticuerpo biespecífico Flt3/CD3 P5F7.

Este ejemplo ilustra que el anticuerpo biespecífico anti-Flt3/CD3 P5F7 dirige eficazmente las células T autólogas para eliminar los blastos de AML *ex vivo*.

Para determinar la actividad citotóxica mediante el uso de células T del paciente y células AML, se adquirieron aspirados de médula ósea frescos del Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, WA). El número de células diana (blastos AML) y células efectoras (células T) se determinó mediante tinción de cada muestra con CD3 antihumano PerCP-cy5.5 (BioLegend, San Diego, CA), anticuerpo BV 510 anti-CD8 humano (BioLegend, San Diego, CA), BUV650 anti-CD4 humano (BioLegend, San Diego, CA), PE-Texas Red anti-CD33 humano (BioLegend, San Diego, CA), APC anti-Flt3 humano (BD Biosciences, San Jose, CA). Doscientos cincuenta mil (250.000) células totales de médula ósea de cada paciente se

sembraron en placas de 24 pocillos en 1 mL de medio, y se cultivaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ 5 %. El anticuerpo biespecífico P5F7 Flt3/CD3 se diluyó a 10 nM en medio RPMI completo y se prepararon diluciones seriada 10 veces de 5 puntos (intervalo de dosis de 10 nM a 0,01 nM). El ensayo de citotoxicidad se inició mediante la adición de anticuerpo biespecífico diluido a las placas e incubación de las células a 37 °C durante 4 días.

Después de 4 días de incubación, la viabilidad de las células del paciente AML, proliferación y activación de las células T se evaluaron contando el número de bastos CD33+CD45dim de AML, el número de células CD4+CD8+ y el porcentaje de células CD25+ CD4+ o CD25+ CD8+ respectivamente, en un instrumento de citometría de flujo LSRII mediante el uso del software FACS Diva (BD Biosciences). Los resultados demuestran una destrucción efectiva de células de AML primarias inducidas por concentraciones crecientes del anticuerpo biespecífico FLT3/CD3 (P5F7) en presencia de células T autólogas (véase las Figuras 5A, 5B, 5C, 5D, 5E y 5F).

Aunque las enseñanzas divulgadas se han descrito con referencia a diversas aplicaciones, métodos, kits y composiciones, se apreciará que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones sin apartarse de las enseñanzas de la presente y la invención reivindicada a continuación. Los ejemplos anteriores se proporcionan para ilustrar mejor las enseñanzas divulgadas y no pretenden limitar el alcance de las enseñanzas presentadas en este documento. Aunque las presentes enseñanzas se han descrito en términos de estos ejemplos de formas de realización, el experto en la técnica entenderá fácilmente que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estos ejemplos de las formas de realización sin una experimentación excesiva. Todas estas variaciones y modificaciones están dentro del alcance de las enseñanzas actuales.

Todas las referencias citadas en la presente, que incluyen patentes, solicitudes de patente, documentos, libros de texto y similares, y las referencias citadas en el mismo, en la medida en que no lo son, se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. En el caso de que una o más de la bibliografía incorporada y materiales similares difieran o contradigan esta solicitud, que incluye, pero sin limitación términos definidos, uso de términos, técnicas descritas o similares, rige esta solicitud.

La descripción anterior y los Ejemplos detallan ciertas formas de realización específicas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa cuán detallado pueda aparecer lo anterior en el texto, la invención se puede poner en práctica de muchas maneras y la invención

se debe interpretar de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, que se une específicamente a Tirosina quinasa tipo Fms 3 (FLT3), donde el anticuerpo comprende

- 5 (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44, 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 246, o 247; (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia mostrada en la 10 SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 248, 249, 251, 252, 253, o 255; y iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 42, 15 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 245, 250, o 254; y/o
- (b) una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 20 189, 192, 195, 257, 261, 263, 265, 268, 270, 273, o 275; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 259, 266, o 271; y (iii) una CDR3 VL que comprende la 25 secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 256, 258, 260, 262, 264, 267, 269, 272, o 274.

2. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a tirosina quinasa tipo Fms 3 (FLT3), donde el anticuerpo comprende:

- 30 una región VH que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, o 233; y/o
- 35 una región VL que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia de VL mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222,

224, 226, 228, 230, o 232.

3. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a FLT3 y compite con el anticuerpo de la reivindicación 1.

4. Un anticuerpo biespecífico donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana, y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmune humana, donde el primer dominio variable del anticuerpo se une al dominio 4 de FLT3 que comprende SEQ ID NO: 279.

5. Un anticuerpo biespecífico donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana, y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmune humana, donde el primer dominio variable del anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 VH, CDR2 VH, y CDR3 VH de la secuencia VH mostrada en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, o 233; y/o una región variable de cadena liviana (VL) que comprende CDR1 VL, CDR2 VL, y CDR3 VL de la secuencia VL mostrada en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, o 232.

6. Un anticuerpo biespecífico donde el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, que comprende un primer dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico que se une específicamente a un antígeno diana, y que comprende un segundo dominio variable del anticuerpo del anticuerpo biespecífico capaz de incorporar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante la unión específica a un antígeno efector ubicado en la célula efectora inmune humana, donde el primer dominio variable del anticuerpo comprende

a. una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante de complementariedad VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 37, 38, 39, 43, 44,

- 45, 49, 50, 54, 55, 56, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 90, 91, 92, 96, 97, 98, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 114, 115, 116, 120, 121, 122, 126, 127, 128, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 246, or 247; (ii) una CDR2 VH que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 40, 41, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 63, 64, 69, 70, 75, 76, 81, 82, 87, 88, 93, 94, 99, 100, 105, 106, 111, 112, 117, 118, 123, 124, 129, 130, 135, 136, 141, 142, 248, 249, 251, 252, 253, o 255; y iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 42, 48, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 245, 250, o 254; y/o
- b. una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195, 257, 261, 263, 265, 268, 270, 273, o 275; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184, 187, 190, 193, 196, 259, 266, o 271; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 176, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 256, 258, 260, 262, 264, 267, 269, 272, o 274.
7. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 6, donde el segundo dominio variable del anticuerpo se une específicamente al antígeno efector CD3.
8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 7, donde el segundo dominio variable del anticuerpo comprende
- a. una región variable de cadena pesada (VH) que comprende (i) una región determinante complementaria VH uno (CDR1) que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 285, 286, o 287; (ii) una CDR2 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 288 o 289; y iii) una CDR3 VH que comprende las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 290; y/o
- b. una región variable de cadena liviana (VL) que comprende (i) una CDR1 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 291; (ii) una CDR2 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 292; y (iii) una CDR3 VL que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 234.

9. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 4 o 5, donde el primer y el segundo dominio variable del anticuerpo de la proteína heterodimérica comprenden modificaciones de aminoácidos en las posiciones 223, 225, y 228 en la región bisagra y en la posición 409 o 368 (esquema de numeración EU) en la región CH3 de una IgG2 humana (SEQ ID NO: 290).
10. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 9, que además comprende una modificación de aminoácido en una o más de las posiciones 265, 330 y 331 de la IgG2 humana.
11. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar como medicamento.
15. El anticuerpo de la reivindicación 14, donde el medicamento es para usar en el tratamiento de un cáncer relacionado con FLT3 que se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin predominante en linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmática, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma no Hodgkin de células B (NHL), leucemia mieloide agudos (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma B-linfooblástico precursor, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma del tejido linfático asociado a la mucosa, linfoma linfocítica de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes del mediastino primario (timo), linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma difuso cutáneo primario de células B grandes (tipo de pierna), linfoma difuso de células B grandes EBV positivo de edad avanzada, linfoma difuso de células B grandes asociado con

- inflamación, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes ALK positivo, linfoma plasmablastico, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico y otro cáncer relacionado con células hematopoyéticas.
- 5
16. Un método de tratamiento de un sujeto que lo necesita que comprende:
- a. proporcionan el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10; y
- 10 b. administrar dicho anticuerpo a dicho sujeto.
17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
18. Un método de tratamiento de una afección asociada con células malignas que expresan FLT3 en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 17.
- 15
19. El método de la reivindicación 18, donde la afección es un cáncer.
20. El método de la reivindicación 19, donde el cáncer es un cáncer relacionado con FLT3 seleccionado del grupo que consiste en mieloma múltiple, neoplasia maligna de células plasmáticas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin predominante en linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y mielomatosis, leucemia de células plasmática, plasmacitoma, leucemia prolinfocítica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma no Hodgkin de células B (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma B-
linfoblástico precursor, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, linfoma del
tejido linfático asociado a la mucosa, linfoma linfocítica de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes del mediastino primario (timo), linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria, granulomatosis
linfomatoide, linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitos, linfoma
- 25
- 30
- 35

primario del sistema nervioso central, linfoma difuso cutáneo primario de células B grandes (tipo de pierna), linfoma difuso de células B grandes EBV positivo de edad avanzada, linfoma difuso de células B grandes asociado con inflamación, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes ALK positivo, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes que surge en la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Hodgkin clásico y otro cáncer relacionado con células hematopoyéticas.

21. Un método de inhibición del crecimiento o progresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan FLT3, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 17 al sujeto.

22. Un método de inhibición de metástasis de células malignas que expresan FLT3 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 17 al sujeto.

23. Un método para inducir la regresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan FLT3, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 17 al sujeto.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18-23, donde el método además comprende administrar una cantidad efectiva de un segundo agente terapéutico.

25. El método de la reivindicación 24, donde el segundo agente terapéutico es una citoquina, TNF α (Factor de necrosis tumoral alfa), un inhibidor de PAP (ácido fosfático fosfatasa), un virus oncolítico, un inhibidor de la quinasa, un inhibidor de la IDO (Indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa), un inhibidor de glutaminasa GLS1, una terapia CAR (Receptor de antígenos quiméricos) de células T o células T, un agonista TLR (Receptor tipo Toll), o una vacuna tumoral.

26. El método de la reivindicación 25, donde la citoquina es IL-15.

27. El método de la reivindicación 25, donde el inhibidor de quinasa es midostaurina, lestaurtinib, sorafenib, sunitinib, quizartinib, ponatinib, crenolanib, palbociclib, o gilteritinib.

28. Un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la

célula huésped de la reivindicación 13 en condiciones que generan la producción del anticuerpo, y aislar el anticuerpo de la célula huésped o cultivo.

RESUMEN

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a FLT3 (Tirosina quinasa tipo Fms 3). La invención proporciona además anticuerpos biespecíficos que se unen a FLT3 y a otro antígeno (por ejemplo, CD3). La invención se refiere además a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, y a métodos para obtener tales anticuerpos (monoespecíficos y biespecíficos). La invención se refiere además a métodos terapéuticos para el uso de estos anticuerpos para el tratamiento de patologías mediadas por FLT3, que incluyen cáncer tal como leucemia mieloide aguda (AML).

10