

ANTICUERPOS Y CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO ESPECÍFICOS**PARA CD123 Y USOS DE LOS MISMOS**Referencia al listado de secuencias

5 La presente solicitud se presenta de forma electrónica mediante EFS-Web e incluye un listado de secuencias presentado de forma electrónica en formato .txt. El archivo .txt contiene un listado de secuencias titulado "PC72333_SEQ_LIST_ST25.txt" creada el 27 de octubre de 2017 y
10 tiene un tamaño de 78 KB. El listado de secuencias contenido en este archive .txt es parte de la especificación y se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

Campo

15 La presente invención se relaciona con anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa que se unen específicamente a CD123. La invención además se relaciona a conjugados (por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco o "ADC") que comprenden los anticuerpos de CD123, composiciones
20 que comprenden los anticuerpos de CD123 o sus conjugados y métodos para utilizar los anticuerpos de CD123 o sus conjugados para tratar las condiciones asociadas con las

células que expresan CD123 (por ejemplo, cáncer).

Antecedentes

CD123 es la cadena alfa del receptor de
5 interleucina 3 (IL-3R α o IL3RAa) que forma un heterodímero
con la cadena CD131 beta común para ayudar a transmitir la
señal de IL-3. El papel biológico de la IL-3 es estimular la
supervivencia y proliferación de células multipotentes. Se
piensa que CD123 está implicado en estimular la proliferación
10 de las células de leucemia mieloide aguda (AML) y tiene una
función directa en la biología del tumor. El CD123 se expresa
de modo frecuente sobre las células madre leucémicas (LSC),
una población celular asociada con la recaída de los
pacientes. Entre los tejidos humanos normales, la expresión
15 de CD123 está en su mayoría limitada a las células
hematopoyéticas, en particular las células dendríticas
plasmacitoides (pDC), que constituyen < 0.4% de las células
mononucleares de sangre periférica en humanos. Como
componentes de la inmunidad innata, las pDC producen grandes
20 cantidades de los interferones de tipo 1 (IFN- α/β) en
respuesta a los estímulos virales y bacterianos. De modo
importante, el CD123 no se expresa en las células madre

hematopoyéticas.

Se espera que nuevos casos de leucemia, linfoma y mieloma cuenten para el 10.2 por ciento de los 1,688,780 nuevos casos de cáncer estimados y diagnosticados en los Estados Unidos en 2017. El CD123 se expresa en las células cancerígenas en una variedad de tumores malignos hematológicos que incluyen la leucemia mieloide aguda (AML) donde su expresión es $> 80\%$. Ejemplos de células sanguíneas cancerígenas que expresan CD123 incluyen blastos y células madre de leucemia. Las enfermedades asociadas con la expresión de CD123 incluyen AML, síndrome mielodisplásico (MDS; de bajo y alto riesgo), leucemia linfocítica aguda (ALL, todos los subtipos), linfoma de células B difusas (DLBCL), leucemia mieloide crónica (CML) y neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN).

Actualmente, los tratamientos de estas enfermedades incluyen más de 50 fármacos individuales con otros bajo estudio y en pruebas críticas. La terapia de radiación también se utiliza comúnmente para tratar cánceres en la sangre y a veces se administra junto con la terapia con fármacos. También se utilizan a inmunoterapia, terapia génica y medicina personalizada. Sin embargo, estas terapias pueden

tener efectos secundarios significativos y reacciones adversas. De este modo, existe la necesidad de tratamientos nuevos y mejorados para los cánceres de la sangre que expresan CD123 (IL-3R α).

5

Sumario

La invención descrita en la presente se dirige a anticuerpos que se unen a CD123 y conjugados, tales como conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden
10 anticuerpos que se unen a CD123 y métodos para preparar y utilizar tales anticuerpos y ADC para tratar trastornos.

Se proporcionan en la presente anticuerpos que se unen específicamente a CD123. En algunas modalidades, la invención proporcionan un anticuerpo aislado que se une
15 específicamente a CD123, en donde el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 24, 32, 44, 51 o 64 y una región variable de cadena ligera
20 (VL) que comprende tres CDR de una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, 28, 39, 48, 57 o 71. En algunas modalidades, la VH puede comprender (i) una

CDR1 de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 33, 52 o 65; (ii) una CDR2 de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 25, 34, 45, 53 o 66; y (iii) una CDR3 de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 35, 46 o 67. En algunas modalidades, la región de VL puede comprender (i) a VL CDR1 que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, 40, 58 o 72; (ii) a VL CDR2 que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, 42, 60 o 74; y (iii) a VL CDR3 que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, 42, 60 o 74. En algunas modalidades, el VH puede comprender (i) una CDR1 de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; (ii) una CDR2 de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; y (iii) una CDR3 de VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, la VL puede comprender (i) una CDR1 de VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; (ii) una CDR2 de VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y (iii) una CDR3 de VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, la VH puede comprender la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 24 o una

variante de la misma con una o varias sustituciones de aminoácidos en los residuos que no están dentro de una CDR y/o la VL puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 o una variante de la misma con una
5 o varias sustituciones de aminoácidos en los aminoácidos que no están dentro de una CDR. En algunas modalidades, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 y una cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 27.

10 También se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD123 y comprende una región variable de cadena pesada producida por el vector de expresión con el No. de acceso ATCC PTA-124283 y una región variable de cadena ligera producida por el vector de expresión con el No. de
15 acceso ATCC PTA-124284.

También se proporcionan anticuerpos aislados que se unen específicamente a CD123 y compiten por la unión a CD123 con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende tres CDR de una VH que comprende
20 las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 6, 24, 32, 44, 51 o 64; y una VL que comprende tres CDR de una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, 28,

39, 48, 57 o 71.

También se proporcionan anticuerpos aislados de CD123 que comprenden una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7, 8 y 9 y una VL que comprende
5 las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18, 19 y 20.

También se proporcionan anticuerpos aislados de CD123 que comprenden una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 7, 25 y 9 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 18, 19 y 20.

10 También se proporcionan anticuerpos aislados de CD123 que comprenden una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 33, 34 y 35 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 40, 41 y 42.

También se proporcionan anticuerpos aislados de
15 anticuerpos CD123 que comprenden una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 33, 45 y 46 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 40, 41 y 42.

También se proporcionan anticuerpos aislados de
20 CD123 que comprenden una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 52, 53 y 54 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 58, 59 y 60.

También se proporcionan anticuerpos aislados de CD123 que comprenden una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 65, 66 y 67 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 72, 73 y 74.

5 En algunas modalidades, los anticuerpos de CD123 como se describen en la presente pueden comprender una etiqueta que contiene glutamina donadora de un acilo diseñada en un sitio específico. En algunas modalidades, la etiqueta puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada
10 del grupo que consiste de Q, LQG, LLQGG (SEQ ID NO:77), LLQG (SEQ ID NO:78), LLSLQG (SEQ ID NO: 79), GGGLLQGG (SEQ ID NO: 80), GLLQG (SEQ ID NO: 81), LLQ, GSPLAQSHGG (SEQ ID NO: 82), GLLQGGG (SEQ ID NO: 83), GLLQGG (SEQ ID NO: 84), GLLQ (SEQ ID NO: 85), LLQLLQGA (SEQ ID NO: 86), LLQGA (SEQ ID NO: 87),
15 LLQYQGA (SEQ ID NO: 88), LLQSG (SEQ ID NO: 89), LLQYQG (SEQ ID NO: 90), LLQLLQG (SEQ ID NO: 91), SLLQG (SEQ ID NO: 92), LLQLQ (SEQ ID NO: 93), LLQLLQ (SEQ ID NO: 94), LLQGR (SEQ ID NO: 95), LLQGPP (SEQ ID NO: 96), LLQGPA (SEQ ID NO: 97), GGGLLQGPP (SEQ ID NO: 98), GGGLLQGA (SEQ ID NO: 99), LLQGPGK
20 (SEQ ID NO: 100), LLQGPG (SEQ ID NO: 101), LLQGP (SEQ ID NO: 102), LLQP (SEQ ID NO: 103), LLQPGK (SEQ ID NO: 104), LLQAPGK (SEQ ID NO: 105), LLQGAPG (SEQ ID NO: 106), LLQGAP (SEQ ID

NO: 107) y LLQLQG (SEQ ID NO: 108). En algunas modalidades, la etiqueta que contiene glutamina es LLQG (SEQ ID NO: 78).

En algunas modalidades, los anticuerpos de CD123 como se describen en la presente pueden comprender una
 5 modificación de aminoácidos en la posición 222, 340 o 370. En algunas modalidades, la modificación de aminoácidos puede ser una sustitución de lisina a arginina. En algunas modalidades, la modificación de aminoácidos puede ser K222R.

En algunas modalidades, los anticuerpos de CD123
 10 como se describen en la presente pueden comprender un enlazador. En algunas modalidades, el enlazador puede escindirse. En algunas modalidades, el enlazador puede seleccionarse del grupo que consiste de Ac-Lys-Gly (acetil-lisina-glicina), ácido aminocaproico, Ac-Lys- β -Ala (acetil-lisina- β -alanina), amino-PEG2 (polietilenglicol)-C2, amino-
 15 PEG3-C2, amino-PEG6-C2, Ac-Lys-Val-Cit-PABC (acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo), amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC, aminocaproil-Val-Cit-PABC, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoilo}piperidin-3,5-diil]bis-Val-Cit-
 20 PABC, [(3S,5S)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoilo}piperidin-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC, putrescina y Ac-Lys-putrescina. En algunas modalidades, el enlazador puede ser

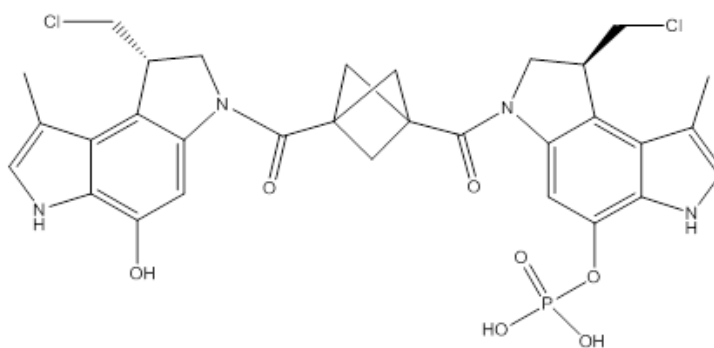
Ac-Lys-Val-Cit-PABC (acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo).

En algunas modalidades, el anticuerpo como se describe en la presente comprende una región constante. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo es de la subclase de IgG1, IgG2 o IgG2Δa, IgG3 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una mutación N60G.

También se proporcionan conjugados que comprenden un anticuerpo de CD123 como se describe en la presente conjugado con un agente. En algunas modalidades, el agente puede seleccionarse del grupo que consiste de un agente citotóxico, un agente inmunomodulador, un agente de formación de imágenes, una proteína terapéutica, un biopolímero y un oligonucleótido. En algunas modalidades, el agente puede ser un agente citotóxico. En algunas modalidades, el agente citotóxico puede seleccionarse del grupo que consiste de una antraciclina, una auristatina, una campotecina, una combretastatina, un dímero CBI, un dímero de ciclopropilpirroloindolina (CPI), un dímero CTI, una

dolastatina, una duocarmicina, una enediina, una geldanamicina, un dímero de indolin-benzodiacetina, una maitansina, una puromicina, un dímero de pirrolobenzodiacetina, un taxano, un alcaloide de vinca, una
 5 tubulisina, una hemiasterlina, una espliceostatina, una pladienolida y estereoisómeros, isósteres, análogos o derivados de los mismos. En algunas modalidades, el agente citotóxico puede ser un dímero CPI. En algunas modalidades, el dímero CPI es CPI-8314. En algunas modalidades, el dímero
 10 CPI puede tener la siguiente estructura:

15



En algunas modalidades, el agente citotóxico puede tener el nombre IUPAC: fosfato diácido de (8S)-8-(clorometil)-6-[(3-{[(1S)-1-(clorometil)-5-hidroxi-8-metil-
 20 1,6-dihidropirrolo[3,2-e]indol-3(2H)-il]carbonil}biciclo[1.1.1]pent-1-il)carbonil]-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrolo[3,2-e]indol-4-ilo. En algunas

modalidades, el agente citotóxico puede ser C₃₁H₃₁Cl₂N₄O₇P o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el agente citotóxico puede estar en forma de sal de ácido trifluoroacético (TFA): C₃₁H₃₁Cl₂N₄O₇P.C₂HF₃O₂.

5 En otras modalidades, el agente citotóxico puede ser MMAD (Monometil Auristatina D), 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-{[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 3377 (N,2-dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxil-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida), 0131 (2-metil-L-proli-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) o 0121 (2-metil-L-proli-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida).

En algunas modalidades, el conjugado puede

comprender la fórmula: anticuerpo-(etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo)-(enlazador)-(agente citotóxico). En algunas modalidades, la etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo puede comprender una secuencia de aminoácidos LLQG (SEQ ID NO: 78) y el enlazador puede comprender acetil-lisina-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonilo. En algunas modalidades, la etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo puede insertarse en el anticuerpo en la posición E294-N297. En algunas modalidades, el conjugado puede además comprender una sustitución de aminoácidos de lisina a arginina en la posición 222 del anticuerpo, de acuerdo con la numeración del índice EU de Kabat (K222R).

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de CD123 descrito en la presente o un ADC de CD123 descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se proporcionan polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de CD123 descrito en la presente. También se proporcionan vectores que comprenden tales polinucleótidos.

También se proporcionan células huésped aisladas que producen de modo recombinante cualquiera de los anticuerpos de CD123 descritos en la presente. También se proporcionan métodos para producir un anticuerpo, que
5 comprenden cultivar tales células huésped bajo condiciones que resultan en la producción del anticuerpo y aislar el anticuerpo a partir de las células huésped o el cultivo.

También se proporcionan métodos para tratar un padecimiento asociado con las células que expresan CD123 en
10 un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos de CD123 descritos en la presente o el conjugado de cualquiera de los anticuerpos y un portador
15 farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el padecimiento es cáncer. En algunas modalidades, el cáncer puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste de leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), neoplasma de células dendríticas plasmacitoides
20 blásticas (BPDCN), leucemia de células pilosas, linfoma de no Hodgkin (NHL) de células B, mieloma múltiple, neoplasma de células plasmáticas malignas, linfoma de Hodgkin, linfoma de

Hodgkin predominante de linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y Mielomatosis, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfoítica de células B, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide crónica (CML),
5 linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores de células B, leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de
10 zona marginal, linfoma de tejido linfático asociado a las mucosas, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes (tímicas) mediastinales primarias, linfoma linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma
15 de células B de la zona marginal nodal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma de células B grandes intravasculares, linfoma de efusión primaria, granulomatosis linfomatoide, linfoma de células B grandes ricas en células T/histiocitos, linfoma del sistema nervioso central primario,
20 linfoma de células B difusas cutáneo primario (del tipo de la pierna), linfoma de células B difusas positivo a EBV de los adultos mayores, linfoma de células B difusas asociadas con

inflamación, linfoma de células B grandes intravasculares, linfoma de células B grandes positivas a ALK, linfoma plasmablastico, linfoma de células B grandes que surgen de la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, 5 linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma de células B difusas y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características intermedias entre el linfoma de células B difusas y el linfoma de Hodgkin clásico y otros linfomas 10 relacionados con las células B. En algunas modalidades, el cáncer es AML.

También se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123, que comprende administrar al 15 sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos de CD123 proporcionados en la presente o el conjugado de cualquiera de los anticuerpos y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 También se proporcionan métodos para inhibir la metástasis de células malignas que expresan CD123 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del

mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos de CD123 proporcionados en la presente o el conjugado de cualquiera de los anticuerpos y un portador
5 farmacéuticamente aceptable.

También se proporcionan métodos para inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de
10 una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos de CD123 proporcionados en la presente o el conjugado de cualquiera de los anticuerpos y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona una
15 cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para tratar un padecimiento (por ejemplo, cáncer o trastorno autoinmune) asociado con la expresión de CD123 en un sujeto
20 en necesidad del mismo. En algunas modalidades, una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de

CD123 como se describen en la presente para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123. En algunas modalidades, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inhibir la metástasis de células malignas que expresan CD123 en un sujeto en necesidad del mismo. En algunas modalidades, una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123.

En otro aspecto, la invención proporciona los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para su uso en tratar un padecimiento (por ejemplo, cáncer o trastorno autoinmune) asociado con la expresión de CD123 en un sujeto en necesidad del mismo. En algunas modalidades, se proporcionan los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123. En algunas

modalidades, se proporcionan los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inhibir la metástasis de células malignas que expresan CD123 en un sujeto en necesidad del mismo. En algunas modalidades, se

5 proporcionan los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123.

En otro aspecto, la invención proporciona un uso de

10 los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente en la fabricación de un medicamento para tratar un padecimiento (por ejemplo, cáncer o trastorno autoinmune) asociado con la expresión de CD123. En algunas modalidades, se proporciona un uso de los anticuerpos de

15 CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento o avance del tumor. En algunas modalidades, se proporciona un uso de los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente en la fabricación de un medicamento

20 para inhibir la metástasis de células malignas que expresan CD123. En algunas modalidades, se proporciona un uso de los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en

la presente en la fabricación de un medicamento para inducir regresión de tumor.

También se proporcionan en la presente métodos para conjugar un anticuerpo a AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI-
5 000638314 (AcLysPABC-CPI-8314). En algunas modalidades, el método comprende preparar una composición que comprende un anticuerpo y AcLysPABC-CPI-8314 en una solución amortiguadora que comprende KPO4 de 30 a 100 mM y NaCl de 150 a 200 mM; agregar transglutaminasa bacteriana a la composición; e
10 incubar la composición para permitir la conjugación del anticuerpo al AcLysPABC-CPI-8314. En algunas modalidades, el pH de la composición es de 7. En algunas modalidades, la composición comprende de 0.5 a 2 unidades (U) de transglutaminasa bacteriana por mg de anticuerpo. En algunas
15 modalidades, la composición comprende 1 U de transglutaminasa bacteriana por mg de anticuerpo. En algunas modalidades, el AcLysPABC-CPI-8314 está presente en un exceso molar de 10 veces para el anticuerpo. En algunas modalidades, la composición se incuba a 25°C durante la noche con mezclado
20 continuo. En algunas modalidades, la composición además comprende 7.5% (v/v) de sulfóxido de dimetilo (DMSO). En algunas modalidades, la solución reguladora comprende KPO4 30

mM y NaCl 150 mM. En algunas modalidades, la solución reguladora comprende KPO4 100 mM y NaCl 200 mM. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-tumor. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-tumor es un anticuerpo de CD123.

Breve descripción de las Figuras/Dibujos

La FIGURA 1 representa los resultados de la transferencia Western del análisis de las células tratadas con IL-3 más anticuerpos ("Ab"). 7G3 es un anticuerpo de referencia y 3D1, 18G3 y 16D6 son anticuerpos de CD123; 8.8 es un anticuerpo de control negativo que no se une a CD123. Se analizaron los niveles de STAT5, STAT5 fosforilado y los de actina.

La FIGURA 2 representa un análisis de citometría de flujo representativo que muestra el porcentaje de las células de tumor que permanecen en la sangre periférica (gráfica izquierda) y médula ósea (gráfica derecha) en un modelo animal después del tratamiento con cualquiera del vehículo o CD123-ADC (CD123-18G3-CPI).

La FIGURA 3 representa una gráfica que resume la longitud de supervivencia (en días) de los animales tratados

con cualquiera del vehículo o ADC de CD123 en las dosis indicadas.

Descripción Detallada

5 La invención descrita en la presente proporciona anticuerpos y conjugados de anticuerpo-fármaco (ADCs) que se unen específicamente a CD123 (por ejemplo, CD123 de humano). La invención también proporciona polinucleótidos que codifican estos anticuerpos, composiciones que comprenden
10 estos anticuerpos y métodos para elaborar y utilizar estos anticuerpos. La invención también proporciona métodos para tratar trastornos asociados con la expresión de CD123 en un sujeto, tal como cáncer o enfermedad autoinmune.

15 Técnicas generales

 A menos que se indique de otro modo, la práctica de la presente invención empleará técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología,
20 las cuales están dentro de la técnica del arte. Tales técnicas se explican totalmente en la literatura, tal como en 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
 5 Culture (R.I. 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.);
 10 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 Polimerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994);
 15 Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and 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
 20 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); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

5 Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de la unión específica a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de
10 inmunoglobulina. Como se utiliza en la presente, el término no sólo abarca anticuerpos policlonales o monoclonales, sino también fragmentos de unión al antígeno de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena simple (ScFv) y de dominio (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de
15 tiburón y de camélido) y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o
20 subclases de las mismas) y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante de sus

cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM y varias de estas pueden dividirse aún más en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Como se utiliza en la presente, el término "fragmento de unión al antígeno" o "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que mantiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, CD123). Las funciones de unión del antígeno de un anticuerpo pueden realizarse por los fragmentos de un anticuerpo intacto. 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 de Fd que consiste de la región variable de cadena pesada (VH) y dominios de CH1; un fragmento de Fv de los dominios de VL y VH de un brazo simple

de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio simple (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989) y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada.

Un anticuerpo, un ADC o un polipéptido que "se une
5 de preferencia" o "se une específicamente" (utilizado de forma intercambiable en la presente) a un objetivo (por ejemplo, a la proteína CD123) es un término bien entendido en la técnica y métodos para determinar tal unión específica o preferente también se conocen bien en la técnica. Se dice que
10 una molécula muestra una "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia de modo más frecuente, más rápido, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que cuando lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une
15 específicamente" o "se une de preferencia" a un objetivo si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que cuando se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o de preferencia a un epítipo de CD123 es un anticuerpo que une su
20 epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que cuando se une con otros epítipos de CD123 o con epítipos que no son de CD123. También se entenderá que

por ejemplo, al leer esta definición, un anticuerpo (o porción o epítopo) que se une específicamente o de preferencia a un primer objetivo puede o no unirse de forma específica o preferente a un Segundo objetivo. Como tal, la
5 "unión específica" o "unión preferente" no requiere de forma necesaria (aunque puede incluir) de una unión exclusiva. En general, pero no de forma necesaria, la referencia a la unión significa la unión preferente.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a
10 la región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada de anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Como se conoce en la técnica, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera consisten de cuatro regiones de marco (FR) conectadas por tres regiones
15 determinantes de la complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por los FR y con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al
20 menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un procedimiento e base de una variabilidad de secuencias de especies cruzadas (es decir, Kabat et al. Sequences of

Proteins of Immunological Interest, (5^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un procedimiento a base de estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948). Como se utiliza en la presente, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquier procedimiento o mediante una combinación de ambos procedimientos.

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 ambos de Kabat y Chothia, AbM, de contacto y/o definiciones conformacionales o cualquier método de determinación de las CDR bien conocido en la técnica. Las CDR del anticuerpo pueden identificarse como las regiones hipervariables definidas originalmente por Kabat et al. Ver, por ejemplo, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de bucle estructural descritas originalmente por Chothia y otros. Ver, por ejemplo, Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. Otros procedimientos para la identificación de las CDR incluyen la

"definición de AbM", la cual es un compromiso entre Kabat y Chothia y se deriva al utilizar el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys®) o la "definición de contacto" de las CDR basada en los contactos de antígeno observados establecida en MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996. En otro procedimiento denominado en la presente como la "definición conformacional" de las CDR, las posiciones de las CDR pueden identificarse como los residuos que hacen contribuciones entálpicas para unir el antígeno. Ver, por ejemplo, Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008. Incluso otras definiciones limitantes de las CDR pueden no seguir de forma estricta uno de los procedimientos anteriores, pero sin embargo, se superpondrán con al menos una porción de las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse en vista de la predicción o hallazgos experimentales que los residuos o grupos de residuos particulares o incluso todas las CDR que no impactan significativamente la unión al antígeno. Como se utiliza en la presente, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo combinaciones de procedimientos. Los métodos utilizados en la presente pueden utilizar las CDR definidas

de acuerdo con cualquiera de estos procedimientos. Para cualquier modalidad dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden definirse de acuerdo con cualquiera de las definiciones de Kabat, Chothia, extendida, AbM, de contacto
5 y/o conformacional.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de modo intercambiable en la presente para referirse a las cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, de preferencia, relativamente corta (por
10 ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o pueden interrumpirse por aminoácidos no modificados. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se han modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo,
15 formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente etiquetado. También incluidas dentro de la definición son, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de
20 un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entenderá que los polipéptidos pueden aparecer

como cadenas simples o cadenas asociadas.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse al utilizar técnicas bien conocidas en el arte, por ejemplo, tecnologías recombinantes, tecnologías de visualización de fagos, tecnología sintética o combinaciones de tales tecnologías u otras tecnologías ya conocidas en el arte (ver, por ejemplo, Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45: 1628-50, 1999 y Fellouse, F.A., et al, J. MoI. Biol., 373(4):924-40, 2007).

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido" o "ácido nucleico" como se utiliza de forma intercambiable en la presente, se refiere a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas y/o sus análogos o cualquier sustrato que pueda incorporarse en una cadena mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, la modificación de la estructura nucleotídica puede impartirse antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse aún más después de la polimerización, tal como

mediante la conjugación con un componente etiquetado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "protecciones", la sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones
5 entre nucleótidos tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen porciones
10 ramificadas, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen queladores (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales
15 oxidantes, etc.), aquellos que contienen agentes alquiladores, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, pueden reemplazarse cualquiera de los grupos hidroxilo presentes de
20 forma ordinaria en los azúcares, por ejemplo, mediante grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o activados para preparar enlaces adicionales o

pueden conjugarse a soporte sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o porciones de grupos protectores orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como azúcares de arabinosa, xilosas o lixosas, piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogoso acíclicos y análogos de nucleósido abásico tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse mediante grupos de enlace alternativo. Esos grupos de enlace alternativo incluyen, pero no se limitan a, modalidades donde el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en donde cada uno de R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (de 1-20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces

en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente aplica a todos los polinucleótidos denominados en la presente, incluyendo ARN y ADN.

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

Como se utiliza en la presente, "sustancialmente puro" se refiere a un material que es al menos 50% puro (es decir, libre de contaminantes), de mayor preferencia, al menos 90% puro, de mayor preferencia, al menos 95% puro, incluso de mayor preferencia, al menos 98% puro y de mayor preferencia, al menos 99% puro.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vectores para la incorporación de insertos de polinucleótidos. Las células huésped incluyen la progenie de una célula huésped simple y la progenie no necesariamente puede ser 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

polinucleótidos de esta invención.

Como se conoce en la técnica, el término "región de Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región de Fc" puede ser
5 una región de Fc de secuencia natural o una región de Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina puede variar, la región de FC de la cadena pesada de IgG normalmente se define para ampliarse desde un residuo de aminoácidos en la posición Cys226 o desde
10 Pro230, hasta el término carboxilo de la misma. La numeración de los residuos en la región de Fc es la del índice EU como en Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región
15 de Fc de una inmunoglobulina comprende en general dos regiones constantes, CH2 y CH3.

Como se utiliza en la presente en relación con un anticuerpo, el término "competir", significa que un primer anticuerpo o un fragmento (o porción)de unión al antígeno
20 del mismo, se une a un epítipo de una manera lo suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo o a una porción de unión al antígeno del mismo, de modo que el

resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítopo cognado pueda detectarse reducido en presencia del segundo anticuerpo comparado con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la
5 unión del segundo anticuerpo a su epítopo también puede detectarse reducido en presencia del primer anticuerpo, puede, pero no necesita ser el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del
10 primer anticuerpo a su epítopo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítopo o ligando cognado, ya sea en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí para unirse a sus
15 epítopos respectivos. Ambos anticuerpos que compiten y compiten de forma cruzada se abarcan por la presente invención. En relación con el mecanismo mediante el cual ocurre tal competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un
20 epítopo o porción común del mismo), el técnico experimentado podría apreciar con base en las enseñanzas provistas en la presente, que tales anticuerpos de competencia y/o

competencia cruzada se abarcan y pueden ser útiles para los métodos descritos en la presente.

Una "región de Fc con secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a las secuencias de aminoácidos de una región de Fc encontrada en la naturaleza. Una "región de Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región de Fc con secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, incluso retiene al menos una función efectora de la región de Fc con secuencia nativa. En algunas modalidades, la región de Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido comparada con una región de Fc de secuencia nativa o con la región de Fc de un polipéptido original, por ejemplo, desde aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y de preferencia, desde aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región de Fc con secuencia nativa o en la región de Fc del polipéptido original. La región de Fc variante en la presente poseerá de preferencia al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una región de Fc con secuencia nativa y/o con una región de Fc de un polipéptido original y de mayor preferencia, al menos

aproximadamente 90% de identidad de secuencia del mismo, de mayor preferencia, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de
5 identidad de secuencia del mismo.

Como se utiliza en la presente, el término "CD123" se refiere a cualquier forma de CD123 y variantes del mismo que mantienen al menos parte de la actividad de CD123. A menos que se indique de modo diferente, tal como mediante la
10 referencia específica a CD123 de humano, CD123 incluye todas las especies de mamíferos de CD123 con secuencia nativa, por ejemplo, de humano, canino, felino, equino y bovino. Secuencias de CD123 ejemplares se muestran en la Tabla 1.

15

Tabla 1

SEQ ID NO.:	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
1	CD123 de humano, péptido de isoforma larga (péptido de señal subrayado)	<u>METDTLLLWVLLLWVPGSTG</u> TKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYSMPAVNNSYQCFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVDFLS CSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAGGTRIGCRFDDIS RLSSGSQSSHILVRGRSAAFIPCTDKFVVFSSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFM HWKMRSHFNRFYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRAR ERVYEFLSAWSTPQRFECDDQEEGANTRAWRTSLIALGTLLALVCVFVICRR YLVMQRLFPRIHPMKDPIGDSFQNDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT
2	CD123 de humano, ECD de isoforma larga con etiquetas Flag y Avi (péptido de señal y etiquetas subrayados)	<u>METDTLLLWVLLLWVPGSTG</u> TKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYSMPAVNNSYQCFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVDFLS CSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAGGTRIGCRFDDIS RLSSGSQSSHILVRGRSAAFIPCTDKFVVFSSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFM HWKMRSHFNRFYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRAR ERVYEFLSAWSTPQRFECDDQEEGANTRAWR <u>GGPPDYKDDDDKGGGLNDIFEAQKIEWHE</u>

3	CD123 de humano, isoforma corta (péptido de señal subrayado)	<u>METDTLLLWVLLLWVPGSTG</u> TKEGKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQ QYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAFGIPCTDKF VVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRFYELQIQKRMQPVIT EQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECQDEEGANTR AWRTSLLLIALGTLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKLV VWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT
5 4	CD123 de Cynomolgus, ECD con etiquetas Flag y Avi (péptido de señal y etiquetas subrayadas)	<u>METDTLLLWVLLLWVPGSTGQ</u> TKEDPNAPIRNLRMKEKAQQLMWDLNRNVTDVECIKGTDYSMPAMNNSYC QFGAISLCEVTNYTVRVASPPFSTWILFPENSGTPRAGAENLTCWVHDVDFL SCSWVVGPAAPADVQYDLYLNNPNSHEQYRCLHYKTARGTQIGCRFDDIA RLSRGSQSSHILVRGRSAAVSIPCTDKFVFFSQIERLTPPNMTGECNETHSF MHWKMKSHFNRFYELRIQKRMQPV RTEQVRDRTTSFQLPNPGTYTVQIR ARETVYEFLSAWSTPQRFECQDEEGASSRAWRGPPDYKDDDDKGGGLN <u>DIFEAQKIEWHE</u>

Como se utiliza en la presente, "anticuerpo de CD123" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CD123 y modula la actividad biológica y/o eventos corriente abajo mediados por CD123. En algunas modalidades, el anticuerpo de CD123 es un anticuerpo antagonista. Los anticuerpos antagonistas de CD123 abarcan anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (en cualquier grado, incluyendo de forma significativa) la actividad biológica de CD123, incluyendo eventos corriente abajo mediados por CD123, tales como, por ejemplo, la unión y/o señalización corriente abajo de IL-3, fosforilación de STAT5 y supervivencia de células multipotentes. Ejemplos de anticuerpos de CD123 y conjugados de anticuerpo de CD123-fármaco ("ADC de CD123") se proporcionan en la presente.

Como se utiliza en la presente, "tratamiento" es un procedimiento para obtener resultados clínicos benéficos o deseados. Para propósitos de esta invención, los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: reducir la proliferación (o destrucción) de células neoplásicas o cancerosas, inhibir la metástasis de las células neoplásicas, remisión de una enfermedad asociada a CD123 (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), reducir los síntomas que resultan de una enfermedad asociada a CD123 (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), incrementar la calidad de vida de los que sufren de una enfermedad asociada a CD123 (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), reducir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar una enfermedad asociada a CD123 (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), retardar el avance de una enfermedad asociada a CD123 (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), curar una enfermedad asociada a CD123 (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune), y/o prolongar la supervivencia de los sujetos que tienen una enfermedad asociada a CD123 (por ejemplo, cáncer o enfermedad autoinmune).

"Mejorar" significa una ralentización o mejora de

uno o más síntomas cuando se compara con no administrar un anticuerpo de CD123 o un ADC de CD123. "Mejorar" también incluye el acortamiento o reducción de la duración de un síntoma.

5 Como se utiliza en la presente, una "dosificación efectiva" o "cantidad efectiva" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para afectar cualquiera de uno o más resultados benéficos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados benéficos o
10 beneficiosos incluyen eliminar o reducir el riesgo, ralentizar la gravedad o retardar el inicio de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presenten durante el
15 Desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados benéficos o deseados incluyen resultados clínicos tales como una incidencia reductora o mejora de uno más síntomas de diversas enfermedades o padecimientos asociados a CD123 (tales como, por ejemplo, sin limitación, cáncer),
20 reducir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, intensificar el efecto de otro medicamento y/o retardar el avance de la enfermedad de los sujetos asociada a

CD123. Una dosificación efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para propósitos de esta invención, una dosificación efectiva de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para acompañar el tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea de forma directa o indirecta. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación efectiva de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede lograrse o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. De este modo, una "dosificación efectiva" puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos y puede considerarse un agente unitario para dars en una cantidad efectiva si puede ser o se logra un resultado deseado junto con uno o más agentes diferentes.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, de mayor preferencia, un humano. Los mamíferos también incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

Como se utiliza en la presente, "vector" significa un constructo, el cual es capaz de administrar, y de preferencia, expresar uno o más genes o secuencias de interés

en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucarióticas, tales como células productoras.

Como se utiliza en la presente, "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácidos nucleicos 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 intensificador. La secuencia de control de la expresión se enlaza de forma operativa a la secuencia de ácidos nucleicos para transcribirse.

Como se utiliza en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que cuando se combina con un ingrediente activo, permite al ingrediente mantener su actividad biológica y no es reactiva con el Sistema inmune del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar tales

como una solución salina amortiguada por fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para su administración en aerosol o parenteral son la solución salina amortiguada por fosfato (PBS) o la solución salina normal (al 0.9%). Las composiciones que comprenden tales portadores se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21a edición Mack Publishing, 2005).

Como se utiliza en la presente, el término "etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo" o "etiqueta de glutamina" se refiere a un polipéptido o una proteína que contiene uno o más residuos de Gln que actúan como un aceptor de amina transglutaminasa. Ver, por ejemplo, Publicaciones PCT Nos. WO2012059882 y WO2015015448, las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad.

Como se utiliza en la presente, el término " $k_{\text{asociación}}$ ", se refiere a la tasa constante de asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las tasas

constantes ($k_{\text{asociación}}$ y $k_{\text{disociación}}$) y las constantes de disociación de equilibrio se miden al utilizar las IgG y proteínas de CD123 (por ejemplo, proteína de fusión de CD123-Fc).

5 Como se utiliza en la presente, el término " $k_{\text{disociación}}$ ", se refiere a la tasa constante de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

 Como se utiliza en la presente, el término " K_D " se refiere a la constante de disociación de equilibrio de una
10 interacción anticuerpo-antígeno.

 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) modalidades que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción denominada a "aproximadamente X" incluye la
15 descripción de "X". Los márgenes numéricos son inclusivos de los números que definen el margen.

 Como se utiliza en la presente, CPI se refiere a 1,2,8,8a-tetrahidrociclopropa[c]pirrolo[3,2-e]indol-4(5H)-ona o una forma sustituida o derivada del mismo. CPI también
20 puede referirse a la forma seco de CPI o CPI seco, que también se conoce como 8-(clorometil)-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrolo[3,2-e]indol-4-ol o una forma (o formas)

sustituida o derivada del mismo.

Se entenderá que donde sea que las modalidades se describan en la presente con el idioma "que comprende", o de otro modo también se proporcionan modalidades análogas
5 descritas en términos de "que consiste de" y/o "que consiste esencialmente de".

Cuando los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo de Markush u otra agrupación de alternativas, la presente invención no sólo
10 abarca todo el grupo listado como un total, sino cada miembro del grupo de modo individual y todos los subgrupos posibles del grupo principal, sino también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también contempla la exclusión explícita de uno o más de
15 cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como se entenderá comúnmente por
20 cualquiera con experiencia ordinaria en la técnica a la cual pertenece esta invención. En caso de conflicto, controlará la presente especificación incluyendo las definiciones. A través

de toda esta especificación y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprender" o "que comprende" implica la inclusión de un número entero establecido o grupo de números enteros pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. A menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

Se describen en la presente métodos y materiales ejemplares, aunque también pueden utilizarse en la práctica métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente o probarse de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos solo son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

15

Anticuerpos de CD123 y conjugados de anticuerpo-fármaco

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a CD123 (por ejemplo, CD123 de humano (por ejemplo, SEQ ID NO.: 1)) y conjugados (tales como conjugados de anticuerpo-fármaco o ADC) que comprenden un anticuerpo anti-CD123, caracterizado por cualquiera de una o más de las siguientes características: (a) trata, previene mejora uno o

más síntomas de un padecimiento asociado con células malignas que expresan CD123 en un sujeto (por ejemplo, cáncer tal como, sin limitación, AML, B-ALL, HCL, etc.); (b) inhibe el crecimiento o avance del tumor en un sujeto (que tiene un tumor maligno que expresa CD123); (c) inhibe la metástasis de células (malignas) cancerígenas que expresan CD123 en un sujeto (que tiene una o más células malignas que expresan CD123); (d) induce la regresión (por ejemplo, regresión a largo plazo) de un tumor que expresa CD123; y (e) ejerce una actividad citotóxica en células malignas que expresan CD123.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, de cadena simple (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión 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 de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de

aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados de modo covalente. Los anticuerpos pueden ser de murino, rata, humano o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados). En algunas modalidades, el anticuerpo de
5 CD123 como se describe en la presente es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, el anticuerpo de CD123 puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado, anticuerpo de humano o un anticuerpo monoclonal quimérico.

En algunas modalidades, el anticuerpo puede
10 comprender una región constante modificada, tal como, por ejemplo sin limitación, una región constante que tiene un potencial incrementado de provocar una respuesta inmune. Por ejemplo, la región constante puede modificarse para tener una afinidad incrementada a un receptor de Fc gamma tal como, por
15 ejemplo, FcγRI, FcγRIIA o FcγIII. En algunas modalidades, el anticuerpo puede comprender una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmune. En algunas modalidades, la región constante se modifica como se describe
20 en Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999; Solicitud PCT No. PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente del Reino Unido No. 98099518. La Fc puede ser IgG1 de humano, IgG2 de humano,

IgG3 de humano o IgG4 de humano. La Fc puede ser IgG2 de humano que contiene la mutación de A330P331 a S330S331 (IgG2Δa), en la cual los residuos de aminoácidos se numeran con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo silvestre. Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de IgG4 que comprende las siguientes mutaciones (Armour et al., Molecular Immunology 40 585-593, 2003): de E233F234L235 a P233V234A235 (IgG4Δc), en la cual la numeración es con referencia a la IgG4 de tipo silvestre. Incluso en otra modalidad, la Fc es IgG4 de humano de E233F234L235 a P233V234A235 con la supresión G236 (IgG4Δb). En otra modalidad, la Fc es cualquiera de Fc de IgG4 de humano (IgG4, IgG4Δb o IgG4Δc) que contiene la mutación S228 a P228 (Aalberse et al., Immunology 105, 9-19, 2002) de estabilización de la bisagra. En otra modalidad, la Fc puede ser una Fc aglicosilada.

En algunas modalidades, la región constante puede ser aglicosilada al hacer mutar el residuo de unión al oligosacárido (tal como Asn297) y/o flanquear los residuos que son parte de la secuencia de reconocimiento de la glicosilación en la región constante. En algunas modalidades, la región constante está aglicosilada para una glicosilación

enzimáticamente N-enlazada. La región constante puede ser aglicosilada para una glicosilación enzimáticamente N-enlazada o mediante la expresión en una célula huésped deficiente de glicosilación.

5 Una manera para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos a CD123 es al medir la afinidad de unión de los fragmentos de Fab monofuncional del anticuerpo. Para obtener fragmentos de Fab monofuncional, puede escindirse un anticuerpo (por ejemplo, IgG) con papaína o expresarse de modo recombinante. La afinidad de un fragmento de Fab de CD123 de un anticuerpo puede determinarse mediante la resonancia de plasmón de superficie (Sistema de resonancia de plasmón de superficie (SPR) Biacore™ 3000™, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipado con chips (SA) de sensores de estreptavidina inmovilizada previamente o Fc anti-ratón o Fc anti-humano utilizando el amortiguador de ejecución HBS-EP (HEPES 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0.005% v/v). El CD123 de humano biotinilado o fusión de Fc puede diluirse en un amortiguador HBS-EP a una concentración menor de 0.5 µg/mL e inyectarse a través de los canales del chip individual utilizando tiempos de contacto variable para lograr dos márgenes de densidad del antígeno, ya sea 50-200

unidades de respuesta (RU) para los estudios cinéticos detallados o de 800-1,000 RU para los ensayos de detección. Los estudios de regeneración han mostrado que NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v elimina de forma efectiva la unión de Fab
5 mientras mantiene la actividad de CD123 en el chip por más de 200 inyecciones. Normalmente, las diluciones en serie (que abarcan concentraciones de 0.1-10x K_D estimada) de muestras de Fab purificadas se inyectaron durante 1 min a 100 μ L/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2
10 horas. Las concentraciones de las proteínas de Fab se determinan mediante ELISA y/o electroforesis de SDS-PAGE utilizando una concentración conocida de Fab (como se determina mediante el análisis de aminoácidos) como un estándar. Las tasas de asociación cinética ($k_{\text{asociación}}$) y tasas
15 de disociación ($k_{\text{disociación}}$) se obtienen de forma simultánea al ajustar los datos globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) al utilizar el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de
20 disociación de equilibrio (K_D) se calculan como $k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$. Este protocolo es adecuado para su uso al determinar la afinidad de unión de un anticuerpo en cualquier

CD123, incluyendo CD123 de humano, CD123 de otro mamífero (tal como CD123 de ratón, CD123 de rata o CD123 de primate), así como diferentes formas de CD123 (por ejemplo, CD123 glicosilado). La afinidad de unión de un anticuerpo se mide en general a 25°C, pero también puede medirse a 37°C. La afinidad de unión (K_D) del anticuerpo de CD123 como se describe en la presente para CD123 (tal como CD123 de humano (por ejemplo, (SEQ ID NO.: 1) puede ser aproximadamente de 0.002 nM a aproximadamente 6500 nM. En algunas modalidades, la afinidad de unión es aproximadamente cualquiera de 6500 nm, 6000 nm, 5986 nm, 5567 nm, 5500 nm, 4500 nm, 4000 nm, 3500 nm, 3000 nm, 2500 nm, 2134 nm, 2000 nm, 1500 nm, 1000 nm, 750 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nM, 193 nM, 100 nM, 90 nM, 50 nM, 45 nM, 40 nM, 35 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 19 nm, 18 nm, 17 nm, 16 nm, 15 nM, 10 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 0.002 nM. En algunas modalidades, la afinidad de unión es menor que aproximadamente cualquiera de 6500 nm, 6000 nm, 5500 nm, 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.

Como se describen en la presente, los anticuerpos de CD123 pueden elaborarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Para la producción de líneas celulares de hibridoma, la vía y esquema de inmunización del animal huésped se mantienen en general con técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción del anticuerpo, como se describe aún más en la presente. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos de humano y de ratón se conocen en la técnica y/o se describen en la presente.

En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 puede comprender una región variable de cadena pesada (VH) que comprende tres CDR de una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de las Nos. de SEQ ID: 6, 24, 32, 44, 51 o 64. En algunos aspectos de la invención, un anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende tres CDR de una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO.: 17, 28, 39, 48, 57 o 71. En algunos aspectos de la invención, un anticuerpo comprende una VH que comprende tres CDR de una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de Nos. de SEQ ID: 6, 24, 32, 44, 51 o 64 y una

VL que comprende tres CDR de una VL que comprende las
secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO.: 17, 28, 39, 48, 57 o
71. En otras modalidades, un anticuerpo de CD123 puede
comprender una VH que comprende las secuencias de aminoácidos
5 de Nos. de SEQ ID: 7, 8 y 9 y una VL que comprende las
secuencias de aminoácidos de Nos. de SEQ ID: 18, 19 y 20. En
otras modalidades, un anticuerpo de CD123 pueden comprender
una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de Nos. de
SEQ ID: 7, 25 y 9 y una VL que comprende las secuencias de
10 aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 18, 19 y 20. En otras
modalidades, un anticuerpo de CD123 pueden comprender una VH
que comprende las secuencias de aminoácidos de los Nos. de
SEQ ID: 33, 34 y 35 y una VL que comprende las secuencias de
aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 40, 41 y 42. En otras
15 modalidades, un anticuerpo de CD123 pueden comprender una VH
que comprende las secuencias de aminoácidos de los Nos. de
SEQ ID: 33, 45 y 46 y una VL que comprende las secuencias de
aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 40, 41 y 42. En otras
modalidades, un anticuerpo de CD123 pueden comprender una VH
20 que comprende las secuencias de aminoácidos de los Nos. de
SEQ ID: 52, 53 y 54 y una VL que comprende las secuencias de
aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 58, 59 y 60. En otras

modalidades, un anticuerpo de CD123 pueden comprender una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 65, 66 y 67 y una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 72, 73 y 74.

- 5 Las regiones variables de cadena pesada y las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo de CD123 representativas pueden comprender las secuencias de aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 6, 24, 32, 44, 51 y 64 y los Nos. de SEQ ID: 17, 28, 39, 48, 57 y 71, respectivamente.
- 10 Las cadenas ligeras y cadenas pesadas amino del anticuerpo de CD123 representativo pueden comprender las secuencias de aminoácidos de los Nos. de SEQ ID: 15, 27, 37, 47, 55 y 69 y los Nos. de SEQ ID: 23, 30, 43, 49, 62 y 76, respectivamente. Las secuencias del anticuerpo de CD123 representativas se
- 15 muestran en la Tabla 2.0.

Tabla 2.0 Secuencias del anticuerpo de CD123 representativas

Anticuerpo	Secuencias de cadena pesada					Secuencias de cadena ligera				
	CDR1 de HC	CDR2 de HC	CDR3 de HC	VH	HC	CDR1 de LC	CDR2 de LC	CDR3 de LC	VL	LC
18G3	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 8	SEQ ID NO.: 9	SEQ ID NO.: 6	SEQ ID NO.: 15	SEQ ID NO.: 18	SEQ ID NO.: 19	SEQ ID NO.: 20	SEQ ID NO.: 17	SEQ ID NO.: 23
h18G3	SEQ ID NO.: 7	SEQ ID NO.: 25	SEQ ID NO.: 9	SEQ ID NO.: 24	SEQ ID NO.: 27	SEQ ID NO.: 18	SEQ ID NO.: 19	SEQ ID NO.: 20	SEQ ID NO.: 28	SEQ ID NO.: 30
16D6	SEQ ID NO.: 33	SEQ ID NO.: 34	SEQ ID NO.: 35	SEQ ID NO.: 32	SEQ ID NO.: 37	SEQ ID NO.: 40	SEQ ID NO.: 41	SEQ ID NO.: 42	SEQ ID NO.: 39	SEQ ID NO.: 43
h16D6	SEQ ID NO.: 33	SEQ ID NO.: 45	SEQ ID NO.: 46	SEQ ID NO.: 44	SEQ ID NO.: 47	SEQ ID NO.: 40	SEQ ID NO.: 41	SEQ ID NO.: 42	SEQ ID NO.: 48	SEQ ID NO.: 49
3D1	SEQ ID NO.: 52	SEQ ID NO.: 53	SEQ ID NO.: 54	SEQ ID NO.: 51	SEQ ID NO.: 55	SEQ ID NO.: 58	SEQ ID NO.: 59	SEQ ID NO.: 60	SEQ ID NO.: 57	SEQ ID NO.: 62
20D7	SEQ ID NO.: 65	SEQ ID NO.: 66	SEQ ID NO.: 67	SEQ ID NO.: 64	SEQ ID NO.: 69	SEQ ID NO.: 72	SEQ ID NO.: 73	SEQ ID NO.: 74	SEQ ID NO.: 71	SEQ ID NO.: 76

Los anticuerpos de CD123 ejemplares proporcionados en la presente incluyen 18G3, 18G3 (h18G3) humanizado, 16D6, 16D6 (h16D6) humanizado, 3D1 y 20D7 mostrados en la Tabla 2.1. Las secuencias mostradas en la Tabla 2.1 son secuencias de aminoácidos a menos que se indique de otro modo.

Tabla 2.1

SEQ ID NO.:	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
5	Secuencia de nucleótidos 18G3 de VH	CAGGTGAAACTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCGCACAGAGTCTGTCCATTACCTGCACTG TCTCTGGATTCTCATTAAACAGTGGTGACATAAGTTGGATTGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGG CTTGGAGTAATATGGTCTGGCGGAGGCACAAATTATAATTCTCGTCTCATGTCCAGACTGAGCATCACCAA GGACAACCTCCAGGAGTCAAGTGTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACCGCCATATATTATTG TGTAAAGAGATTGGGGTAACTTTTACTTTGACTATTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
6	18G3 de VH con las CDR subrayadas	QVKLKESGPGLVAPAQSL SITCTVSGFSLTSGDISWIRQPPGKLEWLGVIWSGGGTNYNSRLMSRLSITKDNS RSQVFLKMNSLQDDTAIYVCVRDWGNFYFDYWGQGTTLTVSS
7	CDRH1 de 18G3	GFSLTSGDIS
8	CDRH2 de 18G3	VIWSGGGTNYNSRLMS
9	CDRH3 de 18G3	DWGNFYFDY
10	JH de 18G3	WGQGTTLTVSS
11	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
12	Bisagra	EPKSCDRHTHTCPPCP
13	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRELLQGSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
14	CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
15	18G3 de HC	QVKLKESGPGLVAPAQSL SITCTVSGFSLTSGDISWIRQPPGKLEWLGVIWSGGGTNYNSRLMSRLSITKDNS RSQVFLKMNSLQDDTAIYVCVRDWGNFYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD RHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRELL QGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
16	18G3 de VL	GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCACTAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAA ATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTGGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCG GTGGATCTGGGACAGATTCTACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAGGACCTGGCAGTTTATTACTGC AGTCAATCTTATAATCTATACATTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA
17	18G3 de VL con las CDR subrayadas	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLSSGTRKNILAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGGGS GTDFTLTISVQAEDLAVYYCSQSYNLYTFGGGTKLEIK
18	CDRL1 de 18G3	KSSQSLSSGTRKNILA
19	CDRL2 de 18G3	WASTRQS
20	CDRL3 de 18G3	SQSYNLYT
21	JK de 18G3	FGGGTKLEIK
22	CL	(R)TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC
23	18G3 de LC	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLSSGTRKNILAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGGGS GTDFTLTISVQAEDLAVYYCSQSYNLYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC
24	h18G3 de VH con las CDR subrayadas	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSGDISWVRQAPGKLEWVAVIWSGGGTNYGSRLMSRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGNFYFDYWGQGTTLTVSS
25	CDRH2 de h18G3	VIWSGGGTNYGSRLMS
26	JH de h18G3	WGQGTTLTVSS
27	HC de h18G3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSGDISWVRQAPGKLEWVAVIWSGGGTNYGSRLMSRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGNFYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDRHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP RELLQGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPG

5

10

15

20

28	h18G3 de VL con las CDR subrayadas	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLSSGTRKNILAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCSQSYNLYTFGGGTKEIK
29	JK de h18G3	FGQGTKEIK
30	LC de h18G3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLSSGTRKNILAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCSQSYNLYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
31	Secuencia de nucleótidos 16D6 de VH	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATAACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTAACTTTGATATAAGTTGGATTGCGCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTTGAGTAATGTGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAATTAGCTTTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAGGACATCTCCAAAAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAGCAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATATATTACTGTGTAAGAGGGGATACTTACTTCTTGTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCCGTCACCGTCTCATCA
32	16D6 de VH con las CDR subrayadas	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTNFDISWIRQPPGKLEWLGVMTGGGTNYNSAFMSRLSISRDISKQVSLKMSSLQTDITAIYCVRGDTYFFAMDYWGQGTSTVTVSS
33	CDRH1 de 16D6	GFSLTNFDIS
34	CDRH2 de 16D6	VMWTGGGTNYNSAFMS
35	CDRH3 de 16D6	GDTYFFAMDY
36	JH de 16D6	WGQGTSTVTVSS
37	HC de 16D6	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTNFDISWIRQPPGKLEWLGVMTGGGTNYNSAFMSRLSISRDISKQVSLKMSSLQTDITAIYCVRGDTYFFAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRELLQGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	Secuencia de nucleótidos 16D6 de VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAGCAGTGGAACCCGAAAGAACTTCTTGTCTTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATTGGGCATCCACTAGGGGATCTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTITGCAACTTACTACTGTAAACAATCTTATAATCTATACAGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
39	16D6 de VL con las CDR subrayadas	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLSSGTRKNFLSWYQQKTGQSPKLLIYWASTRSGVPPDRFTGSGSGTDFLTISVQTEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKEIK
40	CDRL1 de 16D6	KSSQSLSSGTRKNFLS
41	CDRL2 de 16D6	WASTRGS
42	CDRL3 de 16D6	KQSYNLYT
43	16D6 de LC	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLSSGTRKNFLSWYQQKTGQSPKLLIYWASTRSGVPPDRFTGSGSGTDFLTISVQTEDLAVYYCKQSYNLYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
44	h16D6 de VH con las CDR subrayadas	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNFDISWVRQAPGKLEWVAVMWTGGGTNYQSAFMSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDVFYFFAMDYWGQGLTVTVSS
45	CDRH2 de h16D6	VMWTGGGTNYQSAFMS
46	CDRH3 de h16D6	GDVYFFAMDY
47	h16D6 de HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNFDISWVRQAPGKLEWVAVMWTGGGTNYQSAFMSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDVFYFFAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRELLQGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5

10

15

20

48	h16D6 VL con las CDR subrayadas	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLSSSGTRKNFLSWYQQKPGKAPKLLIYWASTRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIK
49	h16D6 de LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLSSSGTRKNFLSWYQQKPGKAPKLLIYWASTRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCKQSYNLYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
50	Secuencia de nucleótidos 3D1 de VH	GAGGTCCAGCTACAACAGTCTGGACCTGAAGCTGGGGCTTCAAGATGTCCTGTAAGGCTCTGGATACACCTTCAGTGACTACTTCATGAAGTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAACAAATGGTGAAGCTTTCTACAACCATCATTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAATAGACAAATCCTCCAGTACAGCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGACGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCCGCGGGGGAATGCTATGGACTTCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
51	3D1 de VH con las CDR subrayadas	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFSDYFMKWVKQSHGKRLEWIGDINPNNGETFYNNHFKGKATLTIDKSSSTAYMQLNSLTSDDSAVYYCARPRRGNAMDFWGQGTSTVTVSS
52	CDRH1 de 3D1	GYTFSDYFMK
53	CDRH2 de 3D1	DINPNNGETFYNNHFKG
54	CDRH3 de 3D1	PRRGNAMDF
55	3D1 de HC	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFSDYFMKWVKQSHGKRLEWIGDINPNNGETFYNNHFKGKATLTIDKSSSTAYMQLNSLTSDDSAVYYCARPRRGNAMDFWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRELLQGSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKKVSINKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
56	Secuencia de nucleótidos 3D1 de VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCAGTAGGACAGAAGGTCACCATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGAGGCAATCAAAAGAACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAATTTCTGGTATATTTTGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTATTTTGTGCAACAATATATAGTATTCCTGACAGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATACAA
57	3D1 de VL con las CDR subrayadas	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNLRGNQKNILAWYQQKPGQSPKFLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPYTFGGGTKLEIQ
58	CDRL1 de 3D1	KSSQSLNLRGNQKNILA
59	CDRL2 de 3D1	FASTRES
60	CDRL3 de 3D1	QQHYSIPYT
61	JK de 3D1	FGGGTKLEIQ
62	3D1 de LC	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNLRGNQKNILAWYQQKPGQSPKFLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPYTFGGGTKLEIQRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
63	Secuencia de nucleótidos 20D7 de VH	GAAGTACAGCTGCAGCAGTCTGGGCCCCGAGCTTCGGAGACCTGGGACCTCAGTCAAGCTGTCTTGTAAAGCTTCTGGCTACAGTATTACAGATTTCTTATGTACTGGGTAAACATAGGCCAGAATACGGCCTGGAATGGATTGGATGGATTGATCCTGAGGATGGTGAACAAAATATGCTCAGAAGTTCAAAGCAAGGCCCGACTGACTGCAATACGTCCTCCAAAACAGCCTACATGGAAGTCAAGCAGCTGACGCTGAGGACACAGCAACCTATTTTGTGCTAGATGGGGCTATATCACGGATTATTTCTATGGCGGGTTACTTACTGGGGCCGAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTTCA
64	20D7 de VH con las CDR subrayadas	EVQLQQSGPELRRPGTSVKLSCKASGYITDFLMYWVKHRPEYGLEWIGWIDPEDGETKYAQKFQSKARLTADTSKTAAYMELSSLTSEDATYFCARWGYITDYFYGGFTYWGRGTLTVTVSS
65	CDRH1 de 20D7	GYSITDFLMY
66	CDRH2 de 20D7	WIDPEDGETKYAQKFQS
67	CDRH3 de 20D7	WGYITDYFYGGFTY

5

10

68	20D7 JH	WGRGTLVTSS
69	20D7 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITDFLMYWVRQAPGKLEWVAWIDPEDGETKYAQKFQSKARFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYITDYFYGGFTYWGRGTLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDRHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PRELLQGSTYRVVSVLTVHLQDVLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
70	Secuencia de nucleótidos 20D7 de VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCCAGTCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAGCTGCAAA GCAAGTCAGAATATTAATAAGAACTTAGACTGGTATCAGCAAAAGCATGGAGAAGCTCCAAAACCTCTGATAT ATCATACAAACACTTTGCAAATGGGCATCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTACGCACT CACCATCACCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTACTGCTATCAATATAACAGTGGGCCCCACGTTT GGAGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGAAGA
71	20D7 de VL con las CDR subrayadas	DIQMTQSPPVLSASVGDRTLSCKASQNKINKLDWYQQKHGEAPKLLIYHTNTLQMGIPSRFSGSGSGTDYALTIT SLQPEDVATYYCYQYNSGPTFGAGTKLELR
72	CDRL1 de 20D7	KASQNKINKLD
73	CDRL2 de 20D7	HTNTLQM
74	CDRL3 de 20D7	YQYNSGPT
75	JL de 20D7	FGAGTKLELR
76	20D7 de LC	DIQMTQSPPVLSASVGDRTLSCKASQNKINKLDWYQQKHGEAPKLLIYHTNTLQMGIPSRFSGSGSGTDYALTIT SLQPEDVATYYCYQYNSGPTFGAGTKLELRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

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 de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones del marco. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 3 bajo el encabezado de "sustituciones conservadoras". Si tales sustituciones resultan en un cambio de actividad biológica, entonces pueden introducirse en los productos detectados más cambios sustanciales denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 3 o como se describen

aún más a continuación con referencia a las clases de aminoácidos.

Tabla 3: Sustituciones de aminoácidos

5	Residuo original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones ejemplares
	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
10	Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
	Glu (E)	Asp	Asp; Gln
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
	Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
	Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
	Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
15	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
20	Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se acompañan al seleccionar

sustituciones que difieren de forma significativa en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina β o helicoidal, (b) la carga o
5 hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos basados en las propiedades de la cadena lateral:

- (1) No polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 10 (2) Polares sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Acídicas (cargados de forma negativa): Asp, Glu;
- (4) Básicas (cargados de forma positiva): Lys, Arg;
- (5) Residuos que influyen la orientación de la cadena:
Gly, Pro; y
- 15 (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se hacen al intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de sustitución que puede hacerse, por
20 ejemplo, es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, las cuales son químicamente reactivas por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. Por ejemplo, puede haber

una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede hacerse en una CDR o región de marco de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. En algunas modalidades, la cisteína es canónica. También puede

5 sustituirse cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada del anticuerpo, en general con serina para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. De forma inversa, pueden agregarse enlaces de cisteína en el

10 anticuerpo y mejorar su estabilidad, en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv.

La presente invención también proporciona un conjugado del anticuerpo de CD123 como se describe en la

15 presente o del fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde el anticuerpo se conjuga con un agente (por ejemplo, un agente citotóxico) para una inmunoterapia dirigida (por ejemplo, conjugados de anticuerpo-fármaco o ADC) ya sea de forma directa o indirecta mediante un enlazador. Por ejemplo,

20 un agente citotóxico puede enlazarse o conjugarse con el anticuerpo de CD123 del mismo como se describe en la presente para una administración local dirigida de la porción del

agente citotóxico a los tumores (por ejemplo, tumor que expresa CD123).

Los métodos para conjugar el agente citotóxico u otros agentes terapéuticos a los anticuerpos se han descrito en diversas publicaciones. Por ejemplo, la modificación química puede hacerse en los anticuerpos ya sea a través de las aminas de la cadena lateral de lisina o a través de los grupos sulfhidrilo de la cisteína activados al reducir los enlaces disulfuro entre las cadenas para que ocurra la reacción de conjugación. Ver, por ejemplo, Tanaka et al., FEBS Letters 579:2092-2096, 2005 y Gentle et al., Bioconjugate Chem. 15:658-663, 2004. También se han descrito residuos de cisteína reactiva diseñados en los sitios específicos de anticuerpos para la conjugación específica del fármaco con estequiometría definida. Ver, por ejemplo, Junutula et al., Nature Biotechnology, 26:925-932, 2008. La conjugación utilizando una etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo o una glutamina endógena hecha reactiva (es decir, la capacidad de formar un enlace covalente como un donador de acilo) por el polipéptido diseñado en la presencia de transglutaminasa y una amina (por ejemplo, un agente citotóxico que comprende o se une a una amina reactiva)

también se describe en las solicitudes internacionales WO2012/059882 y WO2015015448, las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad. Las transglutaminasas son γ -glutamyltransferasas de proteína-glutamina (EC 2.3.2.13) que catalizan normalmente la transamidación dependiente del pH de los residuos de glutamina con residuos de lisina. La transglutaminasa utilizada en la invención descrita en la presente puede obtenerse o elaborarse a partir de una variedad de fuentes o diseñarse para catalizar la transamidación de uno o más residuos de glutamina endógenos con uno o más residuos de lisina o agentes donadores de amina que contienen una o más aminas reactivas. Los métodos para utilizar transglutaminasa para preparar los ADC se describen, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 20170043033, incorporada en la presente para referencia en su totalidad.

El ADC comprende un componente de anticuerpo conjugado con un agente farmacéutico, normalmente a través del uso de un enlazador. En algunas modalidades, el ADC descrito en la presente comprende un anticuerpo conjugado específicamente en el sitio con un agente donador de aminas

(por ejemplo, una molécula pequeña acoplada con un enlazador con una unidad donadora de aminos) mediante una etiqueta diseñada que contiene glutamina, una glutamina endógena (es decir, glutaminas nativas sin diseñar, tales como glutaminas en los dominios variables, las CDR, etc.), y/o una glutamina endógena reactiva.

La glutamina endógena puede hacerse reactiva (es decir, la capacidad de formar un enlace covalente como un donador de acilos en presencia de una amina y una transglutaminasa) al modificar uno o más aminoácidos (por ejemplo, supresión, inserción, sustitución o mutación de aminoácidos) en el anticuerpo, mediante la deglicosilación enzimática o al hacerla reaccionar con una transglutaminasa diseñada. En consecuencia, en un aspecto, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende la fórmula: anticuerpo-(T-(X-Y-Za)b)c, en donde: T es 1) una etiqueta que contiene glutamina diseñada en un sitio específico, 2) una glutamina endógena y/o 3) una glutamina endógena hecha reactiva mediante el anticuerpo diseñado o una transglutaminasa diseñada; X es una unidad donadora de aminos; Y es un enlazador; y Z es una porción del agente; X-Y-Z es un agente donador de aminos conjugado específicamente

en el sitio para la etiqueta que contiene glutamina, la glutamina endógena, y/o la glutamina endógena reactiva; a es un número entero de 1 a 6; b es un número entero de 1 a 6; c es un número entero de 1 a 20; y en donde el producto (relación fármaco-anticuerpo) de a, b y c es al menos aproximadamente de 1. Tanto la etiqueta que contiene glutamina, la glutamina endógena, y/o la glutamina reactiva en el anticuerpo y el agente donador de aminos (X-Y-Z) descrito en la presente son sustratos para la transglutaminasa y el enlace entre la etiqueta que contiene glutamina y/o la glutamina endógena/reactiva y el agente donador de aminos, es de la fórmula $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH-}$, en donde NH- se enlaza a un enlazador y a una porción del agente.

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD123 o el conjugado como se describe en la presente comprende una etiqueta que contiene glutamina donadora de acilos diseñada en un sitio específico del anticuerpo (por ejemplo, un término carboxilo, un término amino o en otro sitio del anticuerpo de CD123). En algunas modalidades, la etiqueta comprende un aminoácido glutamina (Q) o una secuencia de aminoácidos LQG, LLQGG (SEQ ID NO.:77), LLQG (SEQ ID NO.:78), LSLSQG (SEQ ID NO.: 79), GGGLLQGG (SEQ ID NO.: 80), GLLQG

(SEQ ID NO.: 81), LLQ, GSPLAQSHGG (SEQ ID NO.: 82), GLLQGGG
 (SEQ ID NO.: 83), GLLQGG (SEQ ID NO.: 84), GLLQ (SEQ ID NO.:
 85), LLQLLQGA (SEQ ID NO.: 86), LLQGA (SEQ ID NO.: 87),
 LLQYQGA (SEQ ID NO.: 88), LLQSG (SEQ ID NO.: 89), LLQYQG
 5 (SEQ ID NO.: 90), LLQLLQG (SEQ ID NO.: 91), SLLQG (SEQ ID
 NO.: 92), LLQLQ (SEQ ID NO.: 93), LLQLLQ (SEQ ID NO.: 94),
 LLQGR (SEQ ID NO.: 95), LLQGPP (SEQ ID NO.: 96), LLQGPA (SEQ
 ID NO.: 97), GLLQGPP (SEQ ID NO.: 98), GLLQGA (SEQ ID NO.:
 99), LLQGPBK (SEQ ID NO.: 100), LLQGP (SEQ ID NO.: 101),
 10 LLQGP (SEQ ID NO.: 102), LLQP (SEQ ID NO.: 103), LLQPK (SEQ
 ID NO.: 104), LLQAPBK (SEQ ID NO.: 105), LLQGAP (SEQ ID NO.:
 106), LLQGAP (SEQ ID NO.: 107) y LLQLQG (SEQ ID NO.: 108).

En algunas modalidades, la etiqueta que contiene
 glutamina donadora de acilo comprende, por ejemplo, LLQG (SEQ
 15 ID NO.: 78) que reemplaza los de aminoácidos E294-N297 de la
 cadena pesada del anticuerpo.

También se proporciona un anticuerpo aislado que
 comprende una etiqueta que contiene glutamina donadora de
 acilos y una modificación de aminoácidos en la posición 222,
 20 340 o 370 del anticuerpo (esquema de numeración EU) en donde
 la modificación es una supresión, inserción, sustitución,
 mutación de aminoácidos o cualquier combinación de las

mismas. En algunas modalidades, la modificación de aminoácidos es una sustitución de lisina a arginina (por ejemplo, K222R, K340R o K370R).

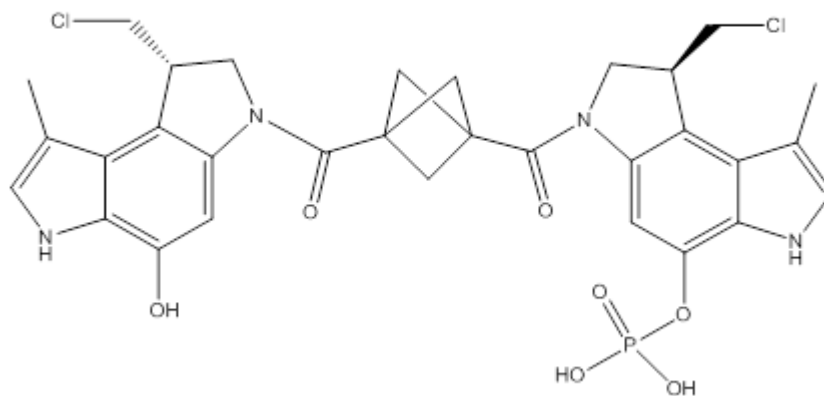
Los agentes que pueden conjugarse con los anticuerpos de CD123 o con los fragmentos de unión al antígeno de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes citotóxicos, agentes inmunomoduladores, agentes de formación de imágenes, proteínas terapéuticas, biopolímeros u oligonucleótidos.

Ejemplos de un agente citotóxico incluyen, pero no se limitan a, antraciclina, una auristatina, una dolastatina, una combretastatina, una duocarmicina, un dímero de pirrolobenzodiacepina, un dímero de indolin-benzodiacepina, una enediina, una geldanamicina, una maitansina, una puromicina, un taxano, un alcaloide de vinca, una campotecina, una tubulisina, una hemiasterlina, una espliceostatina, una pladienolida y estereoisómeros, isósteres, análogos o derivados de los mismos.

En algunos aspectos, el fármaco/agente es un dímero de ciclopropilpirroloindolina (CPI), dímero de CTI o dímero de CBI. Los dímeros de CPI inducen la reticulación del ADN entre hebras y una citotoxicidad potente. La Publicación

Internacional PCT No. WO2015/110935, que se incorpora en la presente para referencia en su totalidad, describe dímeros de CPI y CBI que son útiles en el ADC de CD123 de la presente invención y proporciona métodos para producir los dímeros de
 5 CPI y CBI. Por ejemplo, el agente de fosfato diácido de (8S)-8-(clorometil)-6-[(3-{[(1S)-1-(clorometil)-5-hidroxi-8-metil-1,6-dihidropirrolo[3,2-e]indol-3(2H)-il]carbonil}biciclo[1.1.1]pent-1-il)carbonil]-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrolo[3,2-e]indol-4-il (también conocido
 10 como "dímero CPI-8314" tiene la estructura:

15



y tiene la fórmula C₃₁H₃₁Cl₂N₄O₇P.

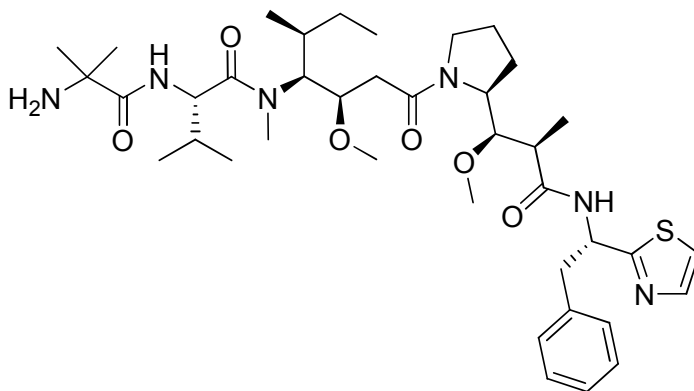
Las antraciclinas se derivan a partir de la
 20 bacteria *Streptomyces* y se han utilizado para tratar una amplia gama de cánceres, tales como leucemias, linfomas, cánceres de mama, uterino, ovárico y de pulmón. Las

antraciclinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, daunorubicina, doxorubicina (es decir, adriamicina), epirubicina, idarubicina, valrubicina y mitoxantrona.

Las dolastatinas y sus análogos y derivados
 5 peptídicos, las auristatinas, son agentes antimitóticos
 potentes que se ha mostrado tienen una actividad anticáncer y
 antifúngica. Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados
 Unidos No. 5,663,149 y Pettit et al., Antimicrob. Agents
 Chemother. 42:2961-2965, 1998. Las dolastatinas y
 10 autristatinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a,
 dolastatina 10, auristatina E, auristatina EB (AEB),
 auristatina EFP (AEFP), MMAD (Monometil Auristatina D o
 monometil dolastatina 10), MMAF (Monometil Auristatina F o N-
 metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproina-fenilalanina),
 15 MMAE (Monometil Auristatina E o N-metilvalina-valina-
 dolaisoleuina-dolaproina-norefedrina), ácido 5-
 benzoilvalérico-éster AE (AEVB) y otras auristatinas
 novedosas (tales como las descritas en la Publicación de los
 Estados Unidos No. 2013/0129753). En algunas modalidades, la
 20 auristatina es 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-
 {(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-
 (1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-

1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:

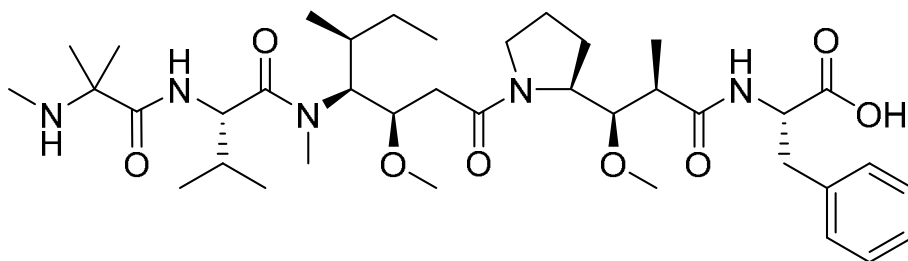
5



10

En algunas modalidades, la auristatina es 3377 (N,2-dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxil-2-feniletil]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil}-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:

15

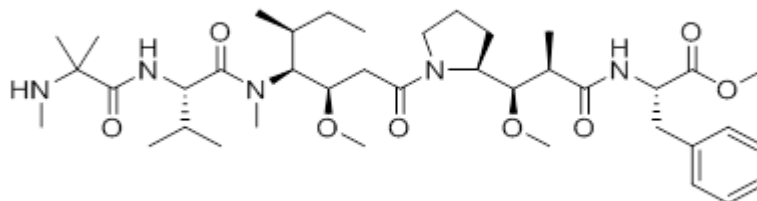


20

En algunas modalidades, la auristatina es 0131-OMe (N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-

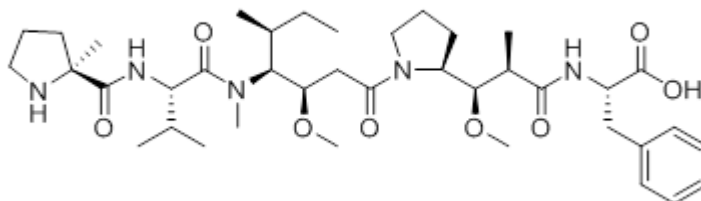
1-metoxi-3-{ [(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:

5

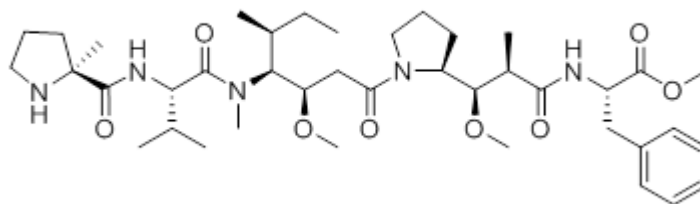


En otras modalidades, la auristatina es 0131 (2-metil-L-proli-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-fenilet-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-yl]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:

15



En otras modalidades, la auristatina es 0121 (2-metil-L-proli-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida) que tiene la siguiente estructura:



5 La camptotecina es un alcaloide de quinolina
citotóxica que inhibe la enzima topoisomerasa I. Ejemplos de
camptotecina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a,
topotecano e irinotecano y sus metabolitos, tales como SN-38.

10 Las combretastatinas son fenoles naturales con
propiedades de interrupción vascular en los tumores. Las
combretastatinas ejemplares y sus derivados incluyen, pero no
se limitan a, combretastatina A-4 (CA-4) y ombrabulina.

15 La duocarmicina y CC-1065 son agentes alquilantes
de AND con potencia citotóxica. Ver Boger y Johnson, PNAS
92:3642-3649 (1995). La duocarmicina y CC-1065 ejemplares
incluyen, pero no se limitan a, (+)-duocarmicina A y (+)-
duocarmicina SA, (+)-CC-1065 y los compuestos como se
describen en la solicitud internacional PCT/IB2015/050280 que
incluye, pero no se limita a, N²-acetil-L-lisil-L-valil-
20 N⁵-carbamoil-N-[4-({[(2-{{[(1S)-1-(clorometil)-3-[(5-
{[(1S)-1-(clorometil)-5-(fosfonooxi)-1,2-dihidro-3H-
benzo[e]indol-3-il]carbonil}tiofen-2-il)carbonil]-2,3-

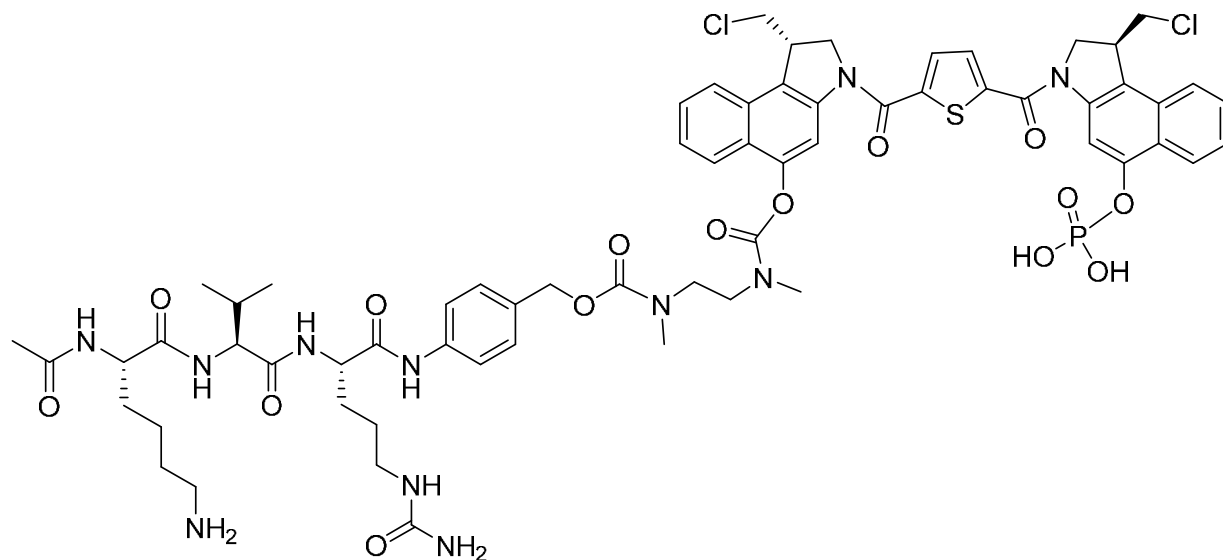
dihidro-1H-benzo[e]indol-5-

il}oxi) carbonil] (metil) amino}etil) (metil) carbamoil]oxi}metil)

fenil]-L-ornitinamida que tiene la estructura:

5

10



N~2~-acetil-L-lisil-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-({[(2-

15 {[(({(8S)-8-(clorometil)-6-[(3-({[(1S)-1-(clorometil)-8-metil-

5-(fosfonooxi)-1,6-dihidropirrolo[3,2-e]indol-3(2H)-

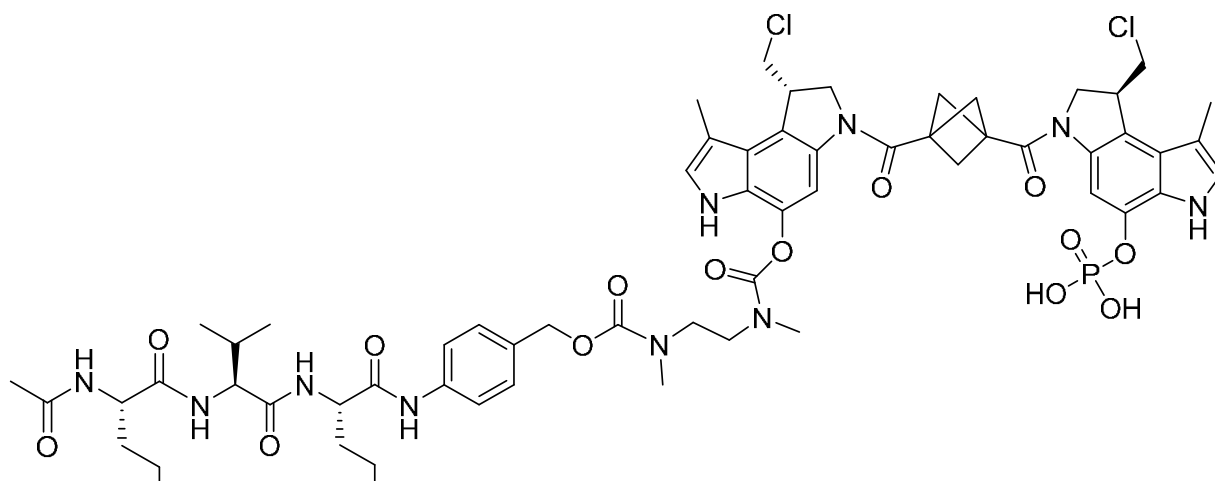
il]carbonil}biciclo[1.1.1]pent-1-il)carbonil]-1-metil-

3,6,7,8-tetrahidropirrolo[3,2-e]indol-4-

il}oxi) carbonil] (metil) amino}etil) (metil) carbamoil]oxi}metil)

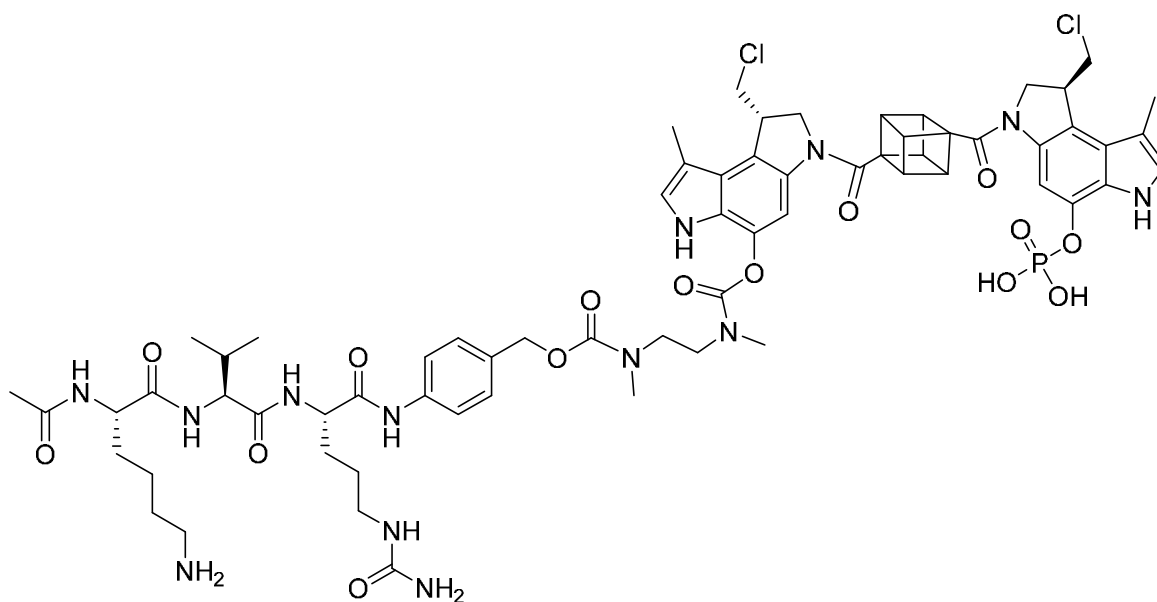
20 fenil]-L-ornitinamida que tiene la estructura:

5



N~2~-acetil-L-lisil-L-valil-N~5~-carbamoil-N-[4-({ [(2-
 10 { [(((8S)-8-(clorometil)-6-[(4-{ [(1S)-1-(clorometil)-8-metil-
 5-(fosfonooxi)-1,6-dihidropirrollo[3,2-e]indol-3(2H)-
 il]carbonil}pentaciclo[4.2.0.0~2,5~.0~3,8~.0~4,7~]oct-1-
 il]carbonil]-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrollo[3,2-e]indol-4-
 il]oxi)carbonil] (metil)amino}etil) (metil)carbamoil]oxi}metil)
 15 fenil]-L-ornitinamida que tiene la estructura:

20



Las enediinas son una clase de productos bacterianos anti-tumor caracterizados por cualquiera de los anillos de nueve y diez miembros o por la presencia de un sistema cíclico de enlaces triple-doble-triple conjugados.

5 Las enediinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, caliqueamicina, esperamicina, uncialamicina, dinemicina y sus derivados.

Las geldanamicinas son antibióticos de ansamicina benzoquinona que se unen a Hsp90 (Proteína de Choque Térmico

10 90) y se han utilizado como fármacos antitumor. Las geldanamicinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, 17-AAG (17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina) y 17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina).

La hemiasterlina y sus análogos (por ejemplo, HTI-

15 286) se unen a la tubulina, interrumpen la dinámica de los microtúbulos y en cantidades estequiométricas despolimerizan los microtúbulos.

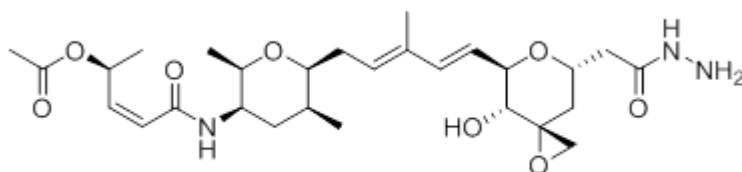
Las maitansinas o sus derivados maitansinoides inhiben la proliferación celular al inhibir la formación de

20 microtúbulos durante la mitosis a través de la inhibición de la polimerización de tubulina. Ver Remillard et al., Science 189:1002-1005, 1975. Las maitansinas y maitansinoides

ejemplares incluyen, pero no se limitan a, mertansina (DM1) y sus derivados, así como ansamitocina.

Los dímeros de pirrolobenzodiacepina (PBD) y los dímeros de indolin-benzodiacepina (IGN) son agentes anti-
 5 tumor que contienen uno o más grupos funcionales o sus equivalentes que se unen al ADN doble. Las moléculas de PBD e IGN se basan en el producto natural de atramicina e interactúan con el ADN de una manera selectiva de la secuencia, con una preferencia por las secuencias de purina-
 10 guanina-purina. Los PBD ejemplares y sus análogos incluyen, pero no se limitan a, SJG-136.

Las espliceostatinas y pladienólidos son compuestos anti-tumor que inhiben el empalme e interactúan con la espliceosoma, SF3b. Ejemplos de espliceostatinas incluyen,
 15 pero no se limitan a, espliceostatina A, FR901464 y el acetato de (2S,3Z)-5-{ [(2R,3R,5S,6S)-6-{ (2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-hidrazinil-2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-metilpenta-2,4-dien-1-il}-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo
 20 que tiene la estructura de



Ejemplos de pladienólidos incluyen, pero no se limitan a, Pladienólido B, Pladienólido D o E7107.

Los taxanos son diterpenos que actúan como agentes anti-tubulina o inhibidores mitóticos. Los taxanos ejemplares
 5 incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel (por ejemplo, TAXOL®) y docetaxel (TAXOTERE®).

Las tubulisinas son productos naturales aislados a partir de una hebra de mixobacterias que se ha mostrado despolimeriza los microtúbulos e inducen el paro mitótico.
 10 Las tubulisinas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, tubulisina A, tubulisina B y tubulisina D.

Los alquiloides de vinca también son agentes anti-tubulina. Los alquiloides de vinca ejemplares incluyen, pero no se limitan a, vincristina, vinblastina, vindesina y
 15 vinorelbina.

En algunas modalidades, el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste de MMAD (Monometil Auristatina D), 0101 (2-metilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(1,3-tiazol-2-il)etil]amino}propil]pirrolidin-1-il}-5-metil-
 20 1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 3377 (N,2-dimetilalanil-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-

carboxil-2-feniletíl]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil]pirrolidin-1-il}-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-
 oxobutil}-N-metil-L-valinamida), 0131 (2-metil-L-proli-N-
 [(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-carboxi-2-
 5 feniletíl]amino}-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-
 il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida),
 0131-OMe (N,2-dimetilalanil-N-[(3R,4S,5S)-3-metoxi-1-{(2S)-2-
 [(1R,2R)-1-metoxi-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-fenilpropan-2-
 il]amino}-2-metil-3-oxopropil]pirrolidin-1-il}-5-metil-1-
 10 oxoheptan-4-il]-N-metil-L-valinamida), 0121 (2-metil-L-proli-
 N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(2S)-1-metoxi-1-oxo-3-
 fenilpropan-2-il]amino}-1-metoxi-2-metil-3-
 oxopropil]pirrolidin-1-il}-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-
 il]-N-metil-L-valinamida) y acetato de (2S,3Z)-5-
 15 {[(2R,3R,5S,6S)-6-{(2E,4E)-5-[(3R,4R,5R,7S)-7-(2-hidrazinil-
 2-oxoetil)-4-hidroxi-1,6-dioxaspiro[2.5]oct-5-il]-3-
 metilpenta-2,4-dien-1-il}-2,5-dimetiltetrahidro-2H-piran-3-
 il]amino}-5-oxopent-3-en-2-ilo.

En algunas modalidades, el agente es un agente
 20 inmunomodulador. Ejemplos de un agente inmunomodulador
 incluyen, pero no se limitan a, ganciclovir, etanercept,
 tacrolimus, sirolimus, voclosporina, ciclosporina,

rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato de mofetilo, metotrexato, glucocorticoide y sus análogos, citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfoquinas, factor de necrosis tumoral (TNF), factores
5 hematopoyéticos, interleucinas (por ejemplo, interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 y IL-21), factores estimulantes de colonias (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF)),
10 interferones (por ejemplo, interferones- α , - β y - γ), el factor de crecimiento de células madre designado como "factor S1", eritropoyetina y trombopoyetina o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades, la porción de agente es un
15 agente de formación de imágenes (por ejemplo, un fluoróforo o un quelador), tal como fluoresceína, rodamina, fósforos de lantánido y derivados de los mismos o un radioisótopo unido a un quelador. Ejemplos de fluoróforos incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC) (por ejemplo,
20 5-FITC), fluoresceína amidita (FAM) (por ejemplo, 5-FAM), eosina, carboxifluoresceína, eritrosina, Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555,

568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700 o 750),
 carboxitetrametilrodamina (TAMRA) (por ejemplo, 5,-TAMRA),
 tetrametilrodamina (TMR) y sulforodamina (SR) (por ejemplo,
 SR101). Ejemplos de queladores incluyen, pero no se limitan
 5 a, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-N,N',N'',N'''-
 tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononan-1,4,7-
 triacético (NOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1-glutárico-
 ácido 4,7-acético (deferoxamina), ácido
 dietilentriaminepentaacético (DTPA) y 1,2-bis(o-
 10 aminofenoxi)ácido etan-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA).

Ejemplos de fluoroforos incluyen, pero no se
 limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC) (por ejemplo,
 5-FITC), amidita de fluoresceína (FAM) (por ejemplo, 5-FAM),
 eosina, carboxifluoresceína, eritrosina, Alexa Fluor® (por
 15 ejemplo, Alexa 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555,
 568, 594, 610, 633, 647, 660, 680, 700 o 750),
 carboxitetrametilrodamina (TAMRA) (por ejemplo, 5,-TAMRA),
 tetrametilrodamina (TMR) y sulforodamina (SR) (por ejemplo,
 SR101).

20 En algunas modalidades, los radioisótopos
 terapéuticos o de diagnóstico u otras etiquetas (por ejemplo,
 etiquetas PET o SPECT) pueden incorporarse en el agente para

su conjugación con los anticuerpos de CD123 o con los fragmentos de unión al antígeno como se describe en la presente. Ejemplos de un radioisótopo u otras etiquetas incluyen, pero no se limitan a, ^3H , ^{11}C , ^{13}N , ^{14}C , ^{15}N , ^{15}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Se , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{94}Tc , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{99}Tc , ^{103}Ru , ^{105}Rh , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{121}Te , ^{122}Te , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{125}Te , ^{126}I , ^{131}I , ^{131}In , ^{133}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{153}Pb , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{165}Tm , ^{166}Dy , ^{166}H , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{169}Yb , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{197}Pt , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{201}Tl , ^{203}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{224}Ac o ^{225}Ac .

En algunas modalidades, el agente es una proteína terapéutica que incluye, pero no se limita a, una toxina, una hormona, una enzima y un factor de crecimiento.

Ejemplos de una toxina de proteína (o polipéptido) incluyen, pero no se limitan a, difteria (por ejemplo, cadena A de difteria A), exotoxina y endotoxina de *Pseudomonas*, ricina (por ejemplo, cadena A de ricina), abrina (por ejemplo, cadena A de abrina), modeccina (por ejemplo, cadena A de modeccina), alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A *Staphylococcal*, proteína antiviral de la

hierba camin, gelonina, toxina difterina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, tricotecenos, péptidos inhibidores de nudos de cistina (ICK) (por ejemplo, ceratotoxinas) y conotoxina (por ejemplo, KIIIA o SmIIIA).

En algunas modalidades, el agente es un polímero biocompatible. Los anticuerpos de CD123 o los fragmentos de unión al antígeno como se describe en la presente puede conjugarse con el polímero biocompatible para incrementar la vida media en el suero y la actividad biológica y/o prolongar las vidas medias *in vivo*. Ejemplos de polímeros biocompatibles incluyen polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol (PEG) o sus derivados del mismo y polímeros biocompatibles que contienen zwiteriones (por ejemplo, un polímero que contiene fosforilcolina).

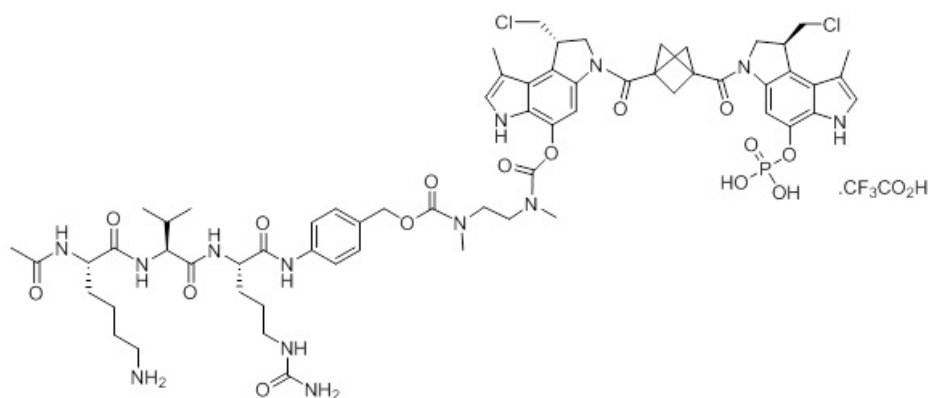
En algunas modalidades, el agente es un oligonucleótido, tal como oligonucleótidos anti-sentido.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado del anticuerpo como se describe en la presente, en donde el conjugado comprende la fórmula: anticuerpo-(etiqueta

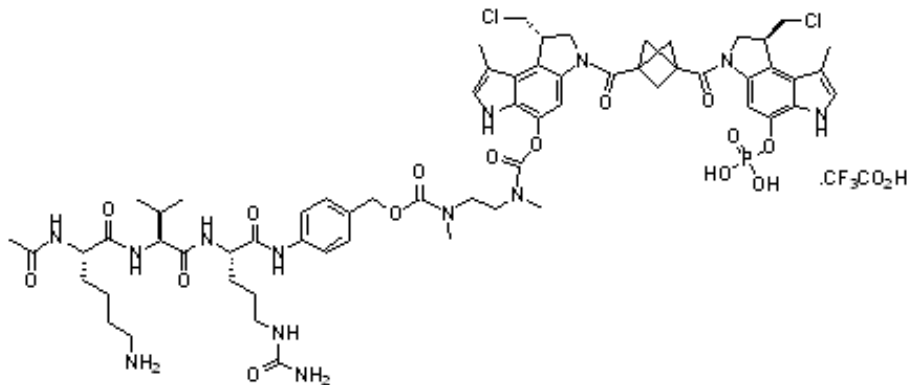
que contiene glutamina donadora de acilo)-(enlazador)-(agente
 citotóxico), en donde la etiqueta que contiene glutamina
 donadora de acilo se diseña en un sitio específico del
 anticuerpo (por ejemplo, en un término carboxilo de la cadena
 5 pesada o ligera, después del residuo T135 en la cadena pesada
 del anticuerpo o en otro sitio), en donde la etiqueta se
 conjuga con un enlazador (por ejemplo, un enlazador que
 contiene una o más aminos reactivas (por ejemplo, la amina
 primaria NH₂)) y en donde el enlazador se conjuga con un
 10 agente citotóxico (por ejemplo, MMAD u otras auristatinas
 tales como 0101, 0131 o 3377).

Ejemplos de un enlazador que contiene una o más
 aminos reactivas incluyen, pero no se limitan a, Ac-Lys-Gly
 (acetil-lisina-glicina), ácido aminocaproico, Ac-Lys-β-Ala
 15 (acetil-lisina-β-alanina), amino-PEG2 (polietilenglicol)-C2,
 amino-PEG3-C2, amino-PEG6-C2 (o amino PEG6-propionilo), Ac-
 Lys-Val-Cit-PABC (acetil-lisina-valina-citrulina-p-
 aminobenciloxicarbonilo), amino-PEG6-C2-Val-Cit-PABC,
 aminocaproil-Val-Cit-PABC, [(3R,5R)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)
 20 etoxi]propanoilo}piperidin-3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC,
 [(3S,5S)-1-{3-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]propanoilo}piperidin-
 3,5-diil]bis-Val-Cit-PABC, putrescina o Ac-Lys-putrescina.

En algunas modalidades, el (enlazador)-(agente citotóxico) es N2-acetil-L-lisil-L-valil-N5-carbamoil-N-[4-(((2-(((8S)-8-(clorometil)-6-[(3-((1S)-1-(clorometil)-8-metil-5-(fosfonooxi)-1,6-dihidropirrolo[3,2-e]indol-3(2H)-il)carbonil}biciclo[1.1.1]pent-1-il)carbonil]-1-metil-3,6,7,8-tetrahidropirrolo[3,2-e]indol-4-il}oxi)carbonil](metil)amino}etil)(metil)carbamoil]oxi}metil)fenil]-L-ornitinamida, con una fórmula molecular $C_{63}H_{82}Cl_2N_{13}O_{15}P$ que tiene la estructura:



En algunas modalidades, el (enlazador)-(agente citotóxico) es la forma salina del ácido trifluoroacético de $C_{63}H_{82}Cl_2N_{13}O_{15}P$ que tiene la siguiente estructura:



La fórmula para la forma salina del ácido trifluoroacético anterior es C₆₃H₈₂Cl₁₂N₁₃O₁₅P.C₂HF₃O₂.

En algunas modalidades, el ADC es 1) anticuerpo-LLQG (SEQ ID NO.: 78)- Ac-Lys-Val-Cit-PABC-CPI-8314. En
5 algunas modalidades, la etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo comprende, por ejemplo, LLQG (SEQ ID NO.: 78) que reemplaza los residuos de aminoácidos E294-N297 en la cadena pesada del anticuerpo. En algunas modalidades, el ADC comprende una modificación de aminoácidos en la posición K222
10 (en la bisagra). En algunas modalidades, la modificación es K222R. Ejemplos del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, h18G3, 18G3, h18G3, 16D6, h16D6, 3D1 y 20D7.

En algunas modalidades, la invención abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que
15 comprenden anticuerpos o ADC descritos en la presente o elaboradas mediante los métodos y tienen las características descritas en la presente. Como se utiliza en la presente, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos o ADC que se unen a CD123. Estas composiciones pueden además comprender
20 excipientes adecuados, tales como los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo amortiguadores, los cuales se conocen bien en la técnica.

Métodos para utilizar los anticuerpos de CD123 y los ADC de los mismos

Los anticuerpos y los ADC de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero no se limitan a métodos de tratamiento terapéutico y métodos de
5 tratamiento diagnóstico.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar un padecimiento asociado con la expresión de CD123 en un sujeto. En algunas modalidades, el método para
10 tratar un padecimiento asociado con la expresión de CD123 en un sujeto comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describe en la presente. Los
15 padecimientos asociados con la expresión de CD123 incluyen, pero no se limitan a la expresión de CD123 anormal, expresión de CD123 alterada o aberrante, células malignas que expresan CD123 y un trastorno proliferativo (por ejemplo, cáncer) o trastorno autoinmune.

20 Por lo tanto, en algunas modalidades, se proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una

cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describe en la presente. Como se utiliza en la presente, cáncer puede ser, por ejemplo y sin limitación, mieloma múltiple, 5 neoplasma de células plasmáticas malignas, linfoma de Hodgkin, linfoma de Hodgkin predominante de linfocitos nodulares, enfermedad de Kahler y Mielomatosis, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, leucemia prolinfoítica de células B, leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de no 10 Hodgkin (NHL) de células B, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL, B-ALL), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de zona marginal, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes, 15 linfoma linfoblástico de precursores de células B, Neoplasma de células dendríticas plasmacitoides blásticas (BPDCN), leucemia mieloide, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, linfoma de zona marginal, linfoma de tejido linfático asociado a las 20 mucosas, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes (tímicas) mediastinales primarias, linfoma

linfoplasmacítico, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma de células B grandes intravasculares, linfoma de efusión primaria, granulomatosis 5 linfomatoide, linfoma de células B grandes ricas en células T/histiocitos, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma de células B difusas cutáneo primario (del tipo de la pierna), linfoma de células B difusas positivo a EBV de los adultos mayores, linfoma de células B difusas asociadas con 10 inflamación, linfoma de células B grandes intravasculares, linfoma de células B grandes positivas a ALK, linfoma plasmablástico, linfoma de células B grandes que surgen de la enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8, linfoma de células B no clasificado con características 15 intermedias entre el linfoma de células B difusas y el linfoma de Burkitt, linfoma de células B no clasificado con características clásico intermedias entre el linfoma de células B difusas y el linfoma de Hodgkin y otros linfomas relacionados con las células B. En algunas modalidades, el 20 cáncer es AML, B-ALL, BPDCN, NHL o HCL.

En algunas modalidades, se proporciona un método para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto

que tiene células malignas que expresan CD123, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describe en la presente. En
5 otras modalidades, se proporciona un método para inhibir células metastásicas que expresan CD123 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describe en
10 la presente. En otras modalidades, se proporciona un método para inducir la regresión del tumor de células malignas en un sujeto, que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describe
15 en la presente.

En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar un trastorno autoinmune en un sujeto que comprende administrar al sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una composición que comprende los
20 anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describe en la presente.

Como se utiliza en la presente, los trastornos

autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso
sistémico, artritis reumatoide, diabetes (Tipo I), esclerosis
múltiple, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca,
dermatomiositis, enfermedad de Graves, tiroiditis de
5 Hashimoto, encefalopatía de Hashimoto, Miastenia gravis,
anemia perniciosa, artritis reactiva, síndrome de Sjogren,
encefalomielitis diseminada aguda, gamma globulinemia,
esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante,
síndrome de antifosfolípidos, síndrome de antisintetasa,
10 alergia atópica, dermatitis atópica, enteropatía autoinmune,
anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune,
enfermedad autoinmune de oído interno, síndrome
linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica
autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendócrino
15 autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, purpura
trombocitopénica autoinmune, urticaria autoinmune, uveitis
autoinmune, enfermedad de Bechet, enfermedad de Castleman,
enfermedad de aglutinina en frío, enfermedad de Crohn,
dermatomiositis, fasciitis eosinofílica, penfigoide
20 gastrointestinal, síndrome de Goodpasture, síndrome de
Guillain-Barré, hidradenitis supurativa, purpura
trombocitopénico idiopático, narcolepsia, pénfigo vulgaris,

anemia perniciosa, polimiositis, cirrhosis biliar primaria, policondritis reincidente, fiebre reumática, arteritis temporal, mielitis transversa, colitis ulcerativa, enfermedad de tejido conectivo no diferenciado, vasculitis y
5 granulomatosis de Wegener.

En otro aspecto, la invención proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente
10 para tratar un padecimiento (por ejemplo, cáncer o trastorno autoinmune) asociado con la expresión de CD123 en un sujeto en necesidad del mismo. En algunas modalidades, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los
15 anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123. En algunas modalidades, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que
20 comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inhibir la metástasis de células malignas que expresan CD123 en un sujeto en necesidad

del mismo. En algunas modalidades, se proporciona una cantidad efectiva de una composición (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente
5 para inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan CD123.

En otro aspecto, la invención proporciona los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para su uso en tratar un padecimiento (por
10 ejemplo, cáncer o trastorno autoinmune) asociado con la expresión de CD123 en un sujeto en necesidad del mismo. En algunas modalidades, se proporcionan los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inhibir el crecimiento o avance del tumor en un sujeto que
15 tiene células malignas que expresan CD123. En algunas modalidades, se proporcionan los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inhibir la metástasis de células malignas que expresan CD123 en un sujeto en necesidad del mismo. En algunas modalidades, se
20 proporcionan los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente para inducir la regresión del tumor en un sujeto que tiene células malignas que expresan

CD123.

En otro aspecto, la invención proporciona un uso de los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente en la fabricación de un medicamento para
5 tratar un padecimiento (por ejemplo, cáncer o trastorno autoinmune) asociado con la expresión de CD123. En algunas modalidades, se proporciona un uso de los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento
10 o avance del tumor. En algunas modalidades, se proporciona un uso de los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente en la fabricación de un medicamento para inhibir la metástasis de células malignas que expresan CD123. En algunas modalidades, se proporciona un uso de los
15 anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente en la fabricación de un medicamento para inducir tumor regresión.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar, diagnosticar y/o monitorear un padecimiento
20 asociado con la expresión de CD123. Por ejemplo, los anticuerpos de CD123 como se describen en la presente puede etiquetarse con una porción detectable tal como un agente de

formación de imágenes y una etiqueta enzima-sustrato. También pueden utilizarse anticuerpos como se describe en la presente para análisis de diagnóstico *in vivo*, tales como la formación de imágenes *in vivo* (por ejemplo, PET o SPECT) o un reactivo
5 de tinción.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente además comprenden un paso de tratar un sujeto con una forma de terapia adicional. En algunas modalidades, la forma de terapia adicional es una terapia anti-cáncer
10 adicional que incluye, pero no se limita a, quimioterapia, radiación, cirugía, terapia hormonal y/o inmunoterapia adicional.

En algunas modalidades, la forma de terapia adicional comprende administrar uno o más agentes
15 terapéuticos además de los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describe en la presente. Uno o más agentes terapéuticos pueden ser, por ejemplo, pero no limitados a un segundo anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial) (por ejemplo,
20 AVASTIN®), un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, HERCEPTIN®), un anticuerpo anti-CD25, un anticuerpo anti-CD33, un anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN®), un anticuerpo

de glicoproteína similar a anti-mucina, un anticuerpo anti-TNF, un anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1 y/o un anticuerpo receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, ERBITUX®)), un inhibidor de la angiogénesis, un

5 agente citotóxico (por ejemplo, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina y mitoxantrona), taxano (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), dolastatina, duocarmicina, enediina, geldanamicina, maitansina, puromicina, alcaloide de vinca (por

10 ejemplo, vincristina), un inhibidor de topoisomerasa (por ejemplo, etopósido), tubulisina, un análogo de pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo), agentes que contienen platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), agentes de alquilación (por ejemplo, melfalana,

15 ciclofosfamida o carmustina) y hemiasterlina), agente inmunomodulador (por ejemplo, prednisona), un agente anti-inflamatorio (por ejemplo, dexametasona), un inhibidor de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, exemestano, letrozol, vorozol, formestano o testolactona), un inhibidor de

20 proteasoma (por ejemplo, bortezomib tal como VELCADE® ([(1R)-3-metil-1-[[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-

[(pirazinilcarbonilo) amino] propil] amino] butil] ácido borónico)

y otros agentes tales como tamoxifeno.

Por ejemplo, en algunas modalidades, se proporciona un método para tratar AML que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de una
5 composición que comprende los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente y un agente terapéutico diferente tal como un agente quimioterapéutico o talidomida o su derivado del mismo (por ejemplo, lenalidomida). En algunas modalidades, el otro agente
10 terapéutico diferente se selecciona del grupo que consiste de bortezomib (por ejemplo, VELCADE®), melfalana, prednisona, doxorubicina, lenalidomida, talidomida, prednisona, carmustina, etopósido, cisplatino, ciclofosfamida y vincristina. En algunas modalidades, el agente terapéutico
15 diferente es bortezomib (por ejemplo, VELCADE®), melfalana o prednisona. En algunas modalidades, el sujeto es reincidente o refractario a la terapia previa de AML.

El anticuerpo de CD123 o los ADC de CD123 pueden administrarse a un individuo mediante cualquier vía adecuada.
20 Deberá entenderse por las personas con experiencia en la técnica que los ejemplos descritos en la presente no pretenden ser limitantes sino ser ilustrativos de las

técnicas ilustrativas. En consecuencia, en algunas modalidades, el anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 se administra a un individuo de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo mediante la vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intracraneal, transdérmica, subcutánea, intra-articular, sublingual, intrasinovial, mediante las vías por insuflación, intratecal, oral, por inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa o localizada. Los nebulizadores comercialmente disponibles para formulaciones líquidas, incluyendo nebulizadores por aspersion y nebulizadores ultrasónicos son útiles para su administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse de forma directa y el polvo liofilizado puede nebulizarse después de su reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 puede estar en aerosol utilizando una formulación de fluorocarbono y un inhalador con dosis medidas o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

En una modalidad, el anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 se administra mediante técnicas de administración

específicas en el sitio o locales dirigidas. Ejemplos de técnicas de administración específicas en el sitio o locales dirigidas incluyen diversas fuentes de depósito implantable del anticuerpo Trop o el ADC de CD123 o catéteres de administración local, tales como catéteres de infusión, catéteres permanentes o catéteres con aguja, injertos sintéticos, envolturas adventicias, sondas y stents u otros dispositivos implantables, portadores específicos del sitio, inyección directa o aplicación directa. Ver, por ejemplo, Publicación PCT No. WO 00/53211 y Patente de los Estados Unidos No. 5,981,568.

Pueden utilizarse diversas formulaciones del anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 para su administración. En algunas modalidades, el anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 puede administrarse neto. En algunas modalidades, del anticuerpo de CD123 (o el ADC de CD123) y un excipiente farmacéuticamente aceptable puede estar en diversas formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica y son relativamente sustancias inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente efectiva. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia o actuar como un diluyente. Los

excipientes adecuados incluyen pero no se limitan a los agentes estabilizadores, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, amortiguadores e intensificadores de penetración en la piel.

5 Excipientes, así como las formulaciones para su administración farmacéutica parenteral y no parenteral se establecen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21a edición, Mack Publishing, 2005.

En algunas modalidades, estos agentes se formulan para su administración por inyección (por ejemplo, vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En consecuencia, estos agentes pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptable tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares.

15 El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, sincronización y repetición, dependerán del individuo particular y del historial médico del individuo.

Los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 tal como se describen en la presente, pueden administrarse mediante cualquier método adecuado, incluso mediante inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). El anticuerpo CD123 o CD123

20

de ADC también puede administrarse por inhalación, como se describe en el presente documento. En general, para la administración de un anticuerpo de CD123 y un ADC de CD123, una dosificación candidata inicial puede ser aproximadamente

5 de 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosificación diaria normal oscila desde aproximadamente a cualquiera de 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, hasta 30 mg/kg, hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriores. Por ejemplo, puede utilizarse la

10 dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg. Para administraciones repetidas por varios días o más, dependiendo del padecimiento, el tratamiento se mantiene hasta que ocurre una supresión

15 deseada de síntomas o hasta que se logran niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para inhibir o retardar el crecimiento/avance del tumor o metástasis de células cancerígenas. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2

20 mg/kg, seguido por una dosis de mantenimiento semial de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo de CD123 o ADC de CD123 o seguido por una dosis de mantenimiento de

aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Otro régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 0.21, aproximadamente 0.5 o aproximadamente 0.8 mg/kg cada semana o cada tres semanas.

5 Otro régimen de dosificación ejemplar comprende administrar dosis incrementadas (por ejemplo, una dosis inicial de 1 mg/kg y un incremento gradual a una o más dosis superiores cada semana o durante un período prolongado de tiempo). Otros regímenes de dosificación también pueden ser útiles,

10 dependiendo del patrón de decaimiento farmacocinético que el profesional desee lograr. Por ejemplo, en algunas modalidades, se contempla la dosificación de una a cuatro veces a la semana. En otras modalidades, la dosificación una vez al mes o se contempla una vez cada dos meses o cada tres

15 meses. El avance de esta terapia se monitorea fácilmente mediante técnicas y análisis convencionales. El régimen de dosificación puede variar con el tiempo (incluyendo el anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 utilizado).

Para el propósito de la presente invención, la

20 dosificación apropiada de un anticuerpo de CD123 o a ADC de CD123 dependerá del anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 (o composiciones del mismo) empleado, el tipo y gravedad de los

síntomas que se van a tratar, si el agente se administra para propósitos terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del sujeto y respuesta del agente, la tasa de eliminación del sujeto para el agente administrado y la discreción del médico

5 tratante. Normalmente, el clínico administrará un anticuerpo de CD123 o a ADC de CD123 hasta que se logre una dosificación que alcance el resultado deseado. La dosis y/o frecuencia pueden variar con el curso del tratamiento. Las consideraciones empíricas, tales como la vida media,

10 contribuirán en general con la determinación de la dosificación. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos, pueden utilizarse para prolongar la vida media del anticuerpo

15 y evitar que el anticuerpo sea atacado por el Sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse con el curso de la terapia y en general, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retraso de los síntomas, por

20 ejemplo, inhibición o retraso del crecimiento de tumor, etc. Alternativamente, pueden ser apropiadas las formulaciones de liberación continua sostenida libera formulaciones de

anticuerpos de CD123 o CD123 ADC. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para lograr una liberación sostenida.

En una modalidad, las dosificaciones de un
5 anticuerpo de CD123 o a ADC de CD123 pueden determinarse de forma empírica en individuos a quienes se ha dado una o más administraciones del anticuerpo de CD123 o su ADC de CD123. A los individuos se les dan dosis incrementadas de un anticuerpo de CD123 o un antagonista de CD123. Para evaluar
10 la eficacia, puede seguirse un indicador de la enfermedad.

La administración de un anticuerpo de CD123 o un ADC de CD123 de acuerdo con el método de la presente invención, puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del padecimiento fisiológico del receptor, si el
15 propósito de la administración es terapéutica o profiláctica y otros factores conocidos por los profesionistas experimentados. La administración de un anticuerpo de CD123 o a ADC de CD123 puede ser esencialmente continua durante un período preseleccionado de tiempo o puede ser en una serie de
20 dosis separadas.

En algunas modalidades, puede estar presente más de un anticuerpo de CD123 o ADC de CD123. Al menos puede estar

presentes uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más anticuerpos de CD123 o ADC de CD123 diferentes. En general, los anticuerpos de CD123 o CD123 ADC pueden tener actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, pueden utilizarse uno o más de los siguientes anticuerpos de CD123: un primer anticuerpo de CD123 dirigido a un epítipo en CD123 y un segundo anticuerpo de CD123 dirigido a un epítipo diferente en CD123.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 utilizado de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento al mezclar un anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21^a edición. Mack Publishing, 2005), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden comprender amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes que incluyen ácido

ascórbico y metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos) polipéptidos; proteínas, tales como albúmina de Suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que contienen el anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como se describen en Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 82:3688, 1985; Hwang, et al., Proc.

Natl Acad. Sci. EE. UU. 77:4030, 1980; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con tiempo de circulación intensificada se describen en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,013,556. Pueden
5 generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada por PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro
10 definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

También pueden atraparse ingredientes activos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante la polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y
15 microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington,
20 The Science and Practice of Pharmacy 21ª edición Mack Publishing, 2005.

Pueden prepararse preparaciones de liberación

sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de viniletileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT TM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para ser utilizadas para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se acompaña fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de las membranas de filtración estériles. Las composiciones del anticuerpo terapéutico de CD123 o ADC de CD123 generalmente se colocan en un contenedor que tiene un Puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución

intravenosa que tiene una tapa perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden estar en formas de dosificación unitaria
5 tales como tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones o supositorios, para su administración oral, parenteral o rectal o su administración mediante inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas tales como
10 tabletas, el ingrediente activo principal se mezcla con un portador farmacéutico, por ejemplo, ingredientes e tableteado convencional tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros diluyentes farmacéuticos,
15 por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención o una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de la misma. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como
20 homogéneas, esto significa que el ingrediente activo se dispersa de forma uniforme a través de toda la composición, de modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en

formas de dosificación unitarias similarmente efectivas tales como tabletas, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida entonces se subdivide en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que
5 contiene de 0.1 a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente invención. Las tabletas o píldoras de la composición novedosa pueden recubrirse o componerse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que menciona la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, la
10 tableta o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y de dosificación externa, la última está en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que
15 el componente interno pase intacto en el duodeno o retardarse en la liberación. Puede utilizarse una variedad de materiales de tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen una cantidad de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como shellac, alcohol
20 cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes adecuados de superficie activa incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como

polioxietilensorbitanos (por ejemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente de superficie activa comprenderán de modo conveniente entre 0.05 y 5% del agente de superficie activa y puede estar entre 0.1 y 2.5%. Si es necesario, se apreciará que pueden agregarse otros ingredientes, por ejemplo, manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las emulsiones adecuadas pueden prepararse utilizando emulsiones grasosas comercialmente disponibles, tales como Intralipid, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El ingrediente activo puede ya sea disolverse en una composición de emulsión premezclada o puede disolverse alternativamente en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de maíz o aceite de almendras) y una emulsión formada después de mezclarla con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden agregarse otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones aplicables contendrán normalmente hasta 20% de aceite, por

ejemplo, entre 5 y 20%. La emulsión grasa puede comprender gotitas de grasa entre 0.1 y 1.0 μm , en particular 0.1 y 0.5 μm y tiene un pH en el margen de 5.5 a 8.0.

Las composiciones de la emulsión pueden ser
5 aquellas preparadas al mezclar un anticuerpo de CD123 o a ADC de CD123 con Intralipid™ o los componentes de las mismas (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes orgánicos o
10 acuosos farmacéuticamente aceptables o mezclas y polvos de los mismos. Las composiciones sólidas o líquidas pueden contener los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se establecen en lo anterior. En algunas modalidades, las composiciones se administran mediante la vía
15 respiratoria oral o nasal para el efecto local o sistémico. De preferencia, las composiciones en los solventes estériles farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente a partir del dispositivo de nebulización o el
20 dispositivo de nebulización puede aspirarse directamente a partir del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a una mascarilla facial, tienda o

máquina de respiración de presión positiva intermitente. La solución, suspensión o composiciones en polvo pueden administrarse, de preferencia, vía oral o nasal, a partir de dispositivos con la administración de la formulación de una
5 manera apropiada.

Composiciones

Las composiciones utilizadas en los métodos de la invención comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo
10 de CD123 o a ADC de CD123 como se describe en la presente. Ejemplos de tales composiciones, así como el modo de formular, también se describen en la sección anterior y siguiente. En algunas modalidades, la composición comprende uno o más anticuerpos de CD123 o CD123 ADC. Por ejemplo, el
15 anticuerpo de CD123 reconoce el CD123 de humano. En algunas modalidades, el anticuerpo de CD123 es un anticuerpo de humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo de CD123 comprende una región constante que es capaz de desencadenar una respuesta
20 inmune deseada, tal como la lisis o ADCC mediada por el anticuerpo. En otras modalidades, el anticuerpo de CD123 comprende una región constante que no desencadena una

respuesta inmune indeseable o no buscada, tal como la lisis o ADCC mediada por el anticuerpo. En otras modalidades, el anticuerpo de CD123 comprende una o más CDR del anticuerpo (Tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o en algunas 5 modalidades, las seis CDR).

Se entenderá que las composiciones pueden comprender más de un anticuerpo de CD123 o ADC de CD123 (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos de CD123 que reconocen diferentes epítomos de CD123). Otras composiciones ejemplares 10 comprenden más de un anticuerpo de CD123 o ADC de CD123 que reconoce los mismos epítomo o especies diferentes de anticuerpos de CD123 o ADC de CD123 que se unen a epítomos of CD123 diferentes (por ejemplo, CD123 de humano).

En algunas modalidades, el anticuerpo de CD123 15 puede administrarse en combinación con la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos incluyen, pero no se limitan a, la administración de un agente quimioterapéutico, una vacuna, una terapia a base de células CAR-T, una terapia de citocinas, una vacuna, un anticuerpo 20 biespecífico de CD123, un inhibidor de otras rutas inmunosupresoras, inhibidores de la angiogénesis, un activador de células T, un inhibidor de una ruta metabólica,

un inhibidor de mTOR, un inhibidor de una trayectoria de adenosina, un inhibidor de tirosina cinasa que incluye pero no se limita a inlyta, inhibidores de ALK y sunitinib, un inhibidor BRAF, un modificador epigenético, un inhibidor IDO1, un inhibidor o supresor de células Treg y/o de células supresoras mieloides derivadas, un inhibidor JAK, un inhibidor STAT, un inhibidor dependiente de ciclina cinasa, un agente bioterapéutico (incluido pero no limitado a anticuerpos para VEGF, VEGFR, EGFR, Her2/neu, otros receptores del factor de crecimiento, CD20, CD40, CD-40L, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, CD123, PD-L1, TIGIT y ICOS), un agente inmunogénico (por ejemplo, células cancerígenas atenuadas, antígenos de tumor, células presentadoras del antígeno tales como células dendríticas pulsadas con ácidos nucleicos o antígeno derivado del tumor, citocinas estimulantes inmunes (por ejemplo, IL-2, IFN α 2, GM-CSF) y células transfectadas con genes que codifican citocinas estimulantes inmunes tales como, pero no limitadas a GM-CSF). Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes de alquilación tales como tiotepa y ciclosfosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y

metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bullatacinona); una campotecina (incluyendo el topotecano
5 análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI);
10 eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalana, novembichin, fenesterina,
15 prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammaI y caliqueamicina phiI1,
20 ver, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo

de neocarzinostatina y cromóforos del antibiótico enediina
relacionado con cromoproteína), aclacinomisin, actinomicina,
autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina,
carabicina, caminomicina, carzinofilina,
5 cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-
diaz-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolin-
doxorubicina, cianomorfolin-doxorubicina, 2-pirrolin-
doxorubicina y desoxidoxorubicina), doxorubicina lisosomal
pegilada, epirubicina, esorubicina, idarubicina,
10 marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido
micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina,
potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina,
estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex,
zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como
15 metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido
fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina,
trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-
mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de
pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina,
20 carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina,
enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona,
propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano,

testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; 5 bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinán; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; 10 pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido pododilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; razoxano; rizoxina; sizofurán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y 15 anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino 20 tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina;

aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera
5 de los anteriores. También se incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-
10 hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de
15 megestrol, exemestano, formestano, fadrozol, vorozol, letrozol y anastrozol; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20 En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con uno o más agentes terapéuticos diferentes que dirigen un modulador de punto de control inmune, tal

como, por ejemplo y sin limitación, un agente dirigido a
 CD123, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, B7-H3, B7-H4, B7-DC (PD-
 L2), B7-H5, B7-H6, B7-H8, B7-H2, B7-1, B7-2, ICOS, ICOS-L,
 TIGIT, CD2, CD47, CD80, CD86, CD48, CD58, CD226, CD155,
 5 CD112, LAIR1, 2B4, BTLA, CD160, TIM1, TIM-3, TIM4, VISTA (PD-
 H1), OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, 4-1BB, 4-BBL,
 DR3, TL1A, CD40, CD40L, CD30, CD30L, LIGHT, HVEM, SLAM
 (SLAMF1, CD150), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229), SLAMF4 (2B4,
 CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (NTB-A), SLAMCF7 (CS1), SLAMF8
 10 (BLAME), SLAMF9 (CD2F), CD28, CEACAM1 (CD66a), CEACAM3,
 CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM1-3AS
 CEACAM3C2, CEACAM1-15, PSG1-11, CEACAM1-4C1, CEACAM1-4S,
 CEACAM1-4L, IDO, TDO, CCR2, ruta de CD39-CD73-adenosina
 (A2AR), BTK, TIK, CXCR2, CCR4, CCR8, CCR5, ruta VEGF, CSF-1 o
 15 un modulador de la respuesta inmune innata. En algunas
 modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con, por
 ejemplo, un anticuerpo anti-PD-L1 antagonista tal como, por
 ejemplo, BMS-936559 (MDX-1105; un anticuerpo de CD123 tal
 como, por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab y pidilizumab; un
 20 antagonista del anticuerpo anti-CTLA-4 tal como, por ejemplo,
 ipilimumab; un anticuerpo antagonista anti-LAG-3 tal como
 BMS-986016 y IMP701; un anticuerpo antagonista anti-TIM-3; un

anticuerpo antagonista anti-B7-H3 tal como, por ejemplo, MGA271; un anticuerpo antagonista anti-VISTA; un anticuerpo antagonista anti-TIGIT; un anticuerpo antagonista anti-CD28; un anticuerpo anti-CD80; un anticuerpo anti-CD86; un anticuerpo antagonista anti-B7-H4; un anticuerpo anti-ICOS agonista; un anticuerpo agonista anti-CD28; un modulador de la respuesta inmune innata (por ejemplo, TLR, KIR, NKG2A) y un inhibidor IDO. En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con un agonista 4-1BB (CD137) tal como, por ejemplo, PF-05082566 o BMS-663513. En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con un agonista OX40 tal como, por ejemplo, un anticuerpo agonista anti-OX-40. En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con un agonista GITR tal como, por ejemplo, un anticuerpo agonista anti-GITR tal como, por ejemplo y sin limitación, TRX518. En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con un inhibidor IDO. En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con una terapia de citocina tal como, por ejemplo y sin limitación, IL-15, CSF-1, MCSF-1, etc.

En algunas modalidades, un anticuerpo de CD123 se utiliza junto con uno o más anticuerpos terapéuticos

diferentes, tal como, por ejemplo y sin limitación, un anticuerpo que se dirige a CD19, CD22, CD40, CD52 o CCR4.

En algunas modalidades, la terapia con el anticuerpo de CD123 puede preceder o seguir el otro
5 tratamiento con el agente mediante intervalos que oscilan de minutos a semanas. En modalidades donde se administran por separado los otros agentes y/o proteínas o polinucleótidos, uno podría en general asegurar que un período significativo de tiempo no caducaría entre cada administración, de modo que
10 el agente y la composición de la presente invención todavía podría ser capaz de ejercer un efecto combinado de forma ventajosa en el sujeto. En tales casos, se contempla que uno puede administrar ambas modalidades durante aproximadamente 12-24 h entre sí y, de mayor preferencia, durante de
15 aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, Puede desearse extenderse significativamente el período de tiempo para su administración; sin embargo, en un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las administraciones respectivas.

20 En algunas modalidades, una composición de anticuerpo de CD123 comprende un segundo agente seleccionado de crizotinib, palbociclib, gemcitabina, ciclofosfamida,

fluorouracilo, FOLFOX, ácido folínico, oxaliplatino, axitinib, malato de sunitinib, tofacitinib, bevacizumab, rituximab y traztuzumab.

En algunas modalidades, una composición del anticuerpo de CD123 se combina con un régimen de tratamiento adicional que comprende una terapia tradicional seleccionada del grupo que consiste de: cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal, inhibición de angiogénesis y cuidados paliativos.

La composición utilizada en la presente invención puede además comprender portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, (Remington: The Science and practice of Pharmacy 21^a edición, 2005, Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a los receptores a las dosificaciones y concentraciones y pueden comprender amortiguadores tales como amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro

de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol
butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o
propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-
pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular
5 (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como
albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros
hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos
tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina,
arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros
10 carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextranos;
agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como
sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones
formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos
(por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no
15 iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol
(PEG). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se
describen aún más en la presente.

Polinucleótidos, vectores y células huésped

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

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas modalidades, la composición comprende un vector de expresión
5 que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. En otro aspecto, la invención proporciona un método para elaborar cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente.

Los polinucleótidos complementarios a cualquiera de
10 las secuencias también se abarcan por la presente invención. Los polinucleótidos pueden ser de una sola hebra (de codificación o antisentido) o de doble hebra y puede ser de moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen
15 intrones y corresponden con una molécula de AND en una manera de uno a uno y las moléculas de ARNm que no contienen intrones. Las secuencias de codificación o sin codificación adicionales pueden, pero no necesitan estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención y un
20 polinucleótido puede, pero no necesita enlazarse a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden contener una secuencia

nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una porción de la misma) o puede comprender una variante de tal secuencia. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, supresiones y/o inserciones de modo que no se reduzca la inmunorreactividad del polipéptido, en relación con una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse en general como se describe en la presente. De preferencia, las variantes muestran al menos aproximadamente 70% de identidad, de mayor preferencia, al menos aproximadamente 80% de identidad, incluso de mayor preferencia, al menos aproximadamente 90% de identidad y de mayor preferencia, al menos aproximadamente 95% de identidad a una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo nativo o porción del mismo.

Se dice que dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima como se describe a continuación. Las comparaciones entre las dos secuencias normalmente se realizan al comparar las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar las

regiones locales de similaridad de la secuencia. Como se utiliza en la presente, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, usualmente de 30 a aproximadamente 75 o
5 de 40 a aproximadamente 50, en la cual puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después que las dos secuencias se alinean de forma óptima.

La alineación óptima de secuencias para su
10 comparación puede llevarse a cabo al utilizar el programa Megalign en el software de programa de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), al utilizar parámetros predeterminados. Este programa abarca diversos esquemas descritos en las siguientes referencias: Dayhoff,
15 M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. En: Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment
20 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 and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, 5 San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80:726-730.

De preferencia, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina al comparar dos secuencias alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación de al menos 10 20 posiciones, en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos, usualmente de 5 a 15 por ciento o de 10 a 12 por ciento, cuando se compara con las secuencias 15 de referencia (la cual no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula al determinar el número de posiciones en los cuales aparecen las bases de ácidos nucleicos idénticas o residuos de aminoácidos en ambas secuencias para 20 producir el número de posiciones coincidentes, al dividir el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño

de la ventana) y multiplicar los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes también pueden o de forma alternativa, ser sustancialmente homólogas a un gen nativo o una porción o complemento de la misma. Tales variantes de polinucleótidos son capaces de hibridarse bajo condiciones moderadamente estrictas para una secuencia de AND de origen natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las condiciones "moderadamente astringentes" incluyen lavar previamente en una solución de 5 X SSC, SDS al 0.5%, EDTA 1.0 mM (pH 8.0); hibridar a 50°C-65°C, 5 X SSC, durante la noche; seguido por lavar dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0.5X y 0.2X que contiene SDS al 0.1 %.

Como se utiliza en la presente, "condiciones altamente astringentes" o "condiciones de alta astringencia" son aquellas que: (1) emplean una baja Resistencia 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 al 0.1% a 50°C; (2) emplear un agente desnaturalizante durante la hibridación, tal como, por ejemplo, formamida al

50% (v/v) formamida con albúmina de Suero de bovino al 0.1% /Ficoll al 0.1%/polivinilpirrolidona al 0.1%/amortiguador de fosfato de sodio 50 ml a pH 6.5 con cloruro de sodio 750 ml, citrato de sodio 75 ml a 42°C; o (3) emplear formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0.75 M, citrato de sodio 0.075 M), fosfato de sodio 50 ml (pH 6.8), pirofosfato de sodio al 0.1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de espermatozoos de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0.1% y dextrán sulfato al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguida por un lavado de alta astringencia que consiste de 0.1 x SSC que contiene EDTA a 55°C. El técnico experimentado reconocerá cómo ajustar la temperatura, la Resistencia iónica, etc. como sea necesario para acomodar los factores tales como la longitud de la sonda y similares.

Se apreciará por aquel con experiencia ordinaria en la técnica, como un resultado de la degeneración del código genético, que existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en la presente. Algunos de estos polinucleótidos llevan una homología mínima para la secuencia de s de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias de

utilidad del codón se contemplan 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
5 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 resultante y la proteína pueden, pero no necesariamente tienen una estructura o función alterada. Los alelos pueden
10 identificarse utilizando técnicas estándar (tales como hibridación, amplificación y/o bases de datos de comparación de secuencias).

Los polinucleótidos de esta invención pueden obtenerse al utilizar la síntesis química, métodos
15 recombinantes o PCR. Los métodos para la síntesis química de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica y no necesitan describirse en detalle en la presente. Aquel con experiencia en la técnica puede utilizar las secuencias proporcionadas en la presente y un sintetizador de ADN
20 comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos que utilizan métodos recombinantes, puede insertarse un polinucleótido que

comprende una secuencia deseada en un vector adecuado y el vector a su vez puede introducirse en una célula huésped adecuada para su replicación y amplificación, como se discute aún más en la presente. Los polinucleótidos pueden insertarse en las células huésped mediante cualesquier medios conocidos 5 en la técnica. Las células se transforman al introducir un polinucleótido endógeno mediante captación directa, endocitosis, transfección, apareamiento F o electroporación. Una vez introducidas, el polinucleótido exógeno puede 10 mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrarse en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de este modo puede aislarse a partir de la célula huésped mediante métodos bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., 15 1989.

Alternativamente, la PCR permite la reproducción de las secuencias de ADN. La tecnología PCR es bien conocida en la técnica y se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 y 4,683,202, así 20 como en PCR: The Polimerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

El ARN puede obtenerse al utilizar el ADN aislado

en un vector apropiado e insertarlo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN entonces puede aislarse al utilizar métodos bien conocidos por aquel con experiencia en la técnica, como
5 se establece en Sambrook et al., 1989, *supra*, por ejemplo.

Los vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas estándar o pueden seleccionarse a partir de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Mientras que el vector
10 de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped prevista para utilizarse, los vectores de clonación útiles tendrán en general la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer un solo objetivo para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden portar
15 genes para un marcador que puede utilizarse en seleccionar clones que contengan el vector. 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
20 de lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles a partir de vendedores comerciales tales como BioRad, Strategene e

Invitrogen.

Los vectores de expresión pueden replicar en general constructos de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Esto
5 implica que un vector de expresión puede replicarse en las células huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero no se limitan a plásmidos, vectores virales, incluyendo los adenovirus, virus adeno-asociados,
10 los retrovirus, cósmidos y vectores de expresión descritos en la Publicación PCT No. WO 87/04462. Los componentes del vector pueden incluir en general, pero no se limitan a uno o más de lo siguiente: una secuencia de señal; un origen de la replicación; uno o más genes marcadores; elementos adecuados
15 de control transcripcional (tales como promotores, intensificadores y terminadores). Para la expresión (es decir, la traducción), uno o más elementos de control traductorial también se requiere usualmente, tal como sitios de unión al ribosoma, sitios de inicio de la traducción y
20 codones de detención.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés puede introducirse en la célula huésped mediante

cualquiera de un número de medios apropiados, incluyendo electroporación, cloruro de calcio que emplea transfección, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrán u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e
5 infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso tal como un virus de vacuna). La elección de introducir vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula huésped.

La invención también proporciona células huésped
10 que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. Pueden utilizarse cualesquier células huésped capaces de sobreexpresar ADN heterólogos para el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Ejemplos no limitantes de células
15 huésped de mamíferos incluyen, pero no se limitan a células COS, HeLa y CHO. Ver también la Publicación PCT No. WO 87/04462. Las células huésped que no son de mamíferos adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o
20 *K. lactis*). De preferencia, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces mayor, de mayor preferencia, 10 veces mayor, incluso de mayor preferencia, 20

veces mayor que del anticuerpo endógeno correspondiente o proteína de interés, si está presente, en las células huésped. La detección de células huésped por una unión específica a CD123 se efectúa mediante un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés.

Kits

La invención también proporciona kits para su uso en los métodos instantáneos. Los kits de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden el anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 como se describe en la presente e instrucciones de uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descritos en la presente. En general, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo de CD123 o el ADC de CD123 para los tratamientos terapéuticos descritos anteriormente.

Las instrucciones que se relacionan con el uso de los anticuerpos de CD123 o los ADC de CD123 como se describen en la presente, incluyen en general información como la dosificación, esquema de dosis y vía de administración para el tratamiento previsto. Los recipientes pueden ser dosis

unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes de múltiples dosis) o subunidades de dosis. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son instrucciones normalmente escritas en una etiqueta o inserto de paquete
5 (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones que se leen por máquina (por ejemplo, instrucciones llevadas en un disco de almacenamiento óptico o magnético).

Los kits de esta invención también están en un
10 embalaje adecuado. El embalaje adecuado incluye, pero no se limita a, viales, botellas, frascos, embalajes flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o de plástico selladas) y similares. También se contemplan paquetes para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo
15 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 frasco que tenga una tapa perforable mediante una aguja de inyección
20 hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o frasco que tenga un tapón

perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de CD123. El recipiente puede además comprender un segundo agente farmacéuticamente activo.

5 Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales, tales como amortiguadores e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o insertos de paquete en o asociado con el recipiente.

10

Depósito biológico

Los materiales representativos de la presente invención se depositaron en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC) el 29 de junio de 2017. El vector que tiene
15 el No. de acceso ATCC PTA-124283 es un polinucleótido que codifica una secuencia de cadena pesada del anticuerpo de CD123 humanizado y el vector que tiene el No. de acceso ATCC PTA-124284 es un polinucleótido que codifica una secuencia de cadena ligera del anticuerpo de CD123 humanizado. Los
20 depósitos se hicieron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Propósito del Procedimiento de

Patentes y Regulaciones del mismo (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 se hará disponible mediante ATCC bajo los términos del

5 Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Pfizer Inc. y ATCC, el cual asegura una disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito después de la emisión de la Patente de los Estados Unidos pertinente o después de permanecer abierta al público por cualquier

10 solicitud de patente extranjera o de los Estados Unidos, lo que sea primero y asegure la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos que tenga derecho a esto en virtud de 35 U.S.C. Sección 122 y las reglas del Comisionado

15 en virtud del presente (incluyendo 37 C.F.R. Sección 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

Se ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiven bajo condiciones adecuadas, los materiales se

20 reemplazarán rápidamente 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 en virtud de la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos solo se ofrecen para propósitos ilustrativos y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente se volverán aparentes por aquellos con experiencia en la técnica a partir de la descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

15 Ejemplo 1: Citotoxicidad *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco de CD123

Este ejemplo ilustra la citotoxicidad de diversos ADC de CD123.

En este estudio, la citotoxicidad de diversos ADC de CD123 se probó al utilizar un ensayo 2D de citotoxicidad *in vitro* en las siguientes líneas celulares de AML: MOLM13, MV411, JVM3, Granata519, OCI-AML3, NB4 y HL60. La Tabla 4

indica el nivel de expresión de CD123 para cada una de las células respectivas utilizadas.

Tabla 4. Nivel de expresión de CD123 en diversas líneas celulares de AML.

	Línea celular						
	MOLM13	MV411	JVM3	Granta519	OCI-AML3	NB4	HL60
Nivel de expresión de CD123	+++	+++	++	++	+	+	-

El primer grupo de los ADC probados fueron ADC de CD123 conjugados a CPI con un enlazador de AcLysValCitPABC. Estos ADC fueron: 18G3-CPI, 16D6-CPI, 3D1-CPI y 20D7-CPI, cada uno de los cuales tiene una Relación de Fármaco: Anticuerpo (DAR) de ~2. La preparación de ADC de CD123 se describe en detalle en el Ejemplo 5, *infra*. Una IgG de control (IgG que no se une a CD123) con el agente CPI con un DAR de ~2 ("Neg.8.8") se utilizó como un control negativo.

Para el ensayo 2D de citotoxicidad *in vitro*, se incubaron células AML con ADC o control a las siguientes dosis: 100 ng/ml, 25 ng/ml, 6.25 ng/ml, 1.56 ng/ml, 0.39 ng/ml, 0.09 ng/ml, 0.024 ng/ml, 0.006 ng/ml, 0.002 ng/ml y

0.0004 ng/ml durante 96 horas. La disponibilidad celular se midió con CelltiterGlo (Promega, Madison, WI) y la luminiscencia se determine al utilizar un lector de placas Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los cálculos del valor de inhibición al 50% (IC50) se generaron al utilizar 4 ajustes de la curva de parámetros XLfit (IDBS, Boston, MA). Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores IC50 de ADC de CD123-CPI en células AML.

10

ADC	IC50 (ng/mL) en células de AML						
	MOLM13	MV411	JVM3	Granta519	OCI-AML3	NB4	HL60
18G3-CPI	0.25 ± 0.04	0.41 ± 0.07	0.69 ± 0.22	0.38 ± 0.01	2.65 ± 0.12	63.92 ± 36.08	>84.4 ± 33.30
16D6-CPI	0.22 ± 0.05	0.4 ± 0.15	0.59 ± 0.24	-	-	-	>105.34 ± 94.66
3D1-CPI	0.33 ± 0.06	-	-	-	-	-	>104.68 ± 95.32
20D7-CPI	0.32 ± 0.14	-	-	-	-	-	-
Neg.8.8-CPI	>88.43 ± 18.66	>90.82 ± 8.64	>77 ± 14.3	>87.85 ± 12.14	>100 ± 0	>100 ± 0	>113.43 ± 19.09

15

Los resultados muestran que los CD123-CPI son citotóxicos para las células que expresan CD123 y son más citotóxicos que un CPI no específico (Neg8.8-CPI). Por ejemplo, en células MOLM13, la IC50 de los ADC 18G3-CPI,

20

16D6-CPI y 3D1-CPI de CD123 fueron 0.25 ± 0.04 ng/mL, 0.22 ± 0.05 ng/mL, 0.33 ± 0.06 ng/mL y 0.32 ± 0.14 ng/mL, respectivamente. En contraste, la IC50 de Neg.8.8-CPI fue $>88.43 \pm 18.66$ (Tabla 5, última hilera). Neg.8.8-CPI con un
5 DAR de ~2 fue sustancialmente menos activo a las mayores dosis probadas (Tabla 5, última hilera). Los valores de IC50 del ADC de CD123 indicado se correlacionan bien con el nivel de expresión de CD123 en las células (Tablas 4 y 5). Por ejemplo, los IC50 de 18G3-CPI en células MV411 que expresan a
10 niveles de CD123, fueron de 0.41 ± 0.07 . En contraste, los IC50 de 18G3-CPI en células NB4 que expresan bajos niveles de CD123, fueron de 63.92 ± 36.08 y los IC50 de 18G3-CPI en células HL60 que no expresan CD123, fue $>84.4 \pm 33.30$.

El ADC de CD123-18G3 ADC que se conjugó con un
15 agente diferente, ya sea con iPr-caliqueamicina o CTI (glucurónido) tuvo un efecto citotóxico similar. El ensayo de citotoxicidad que resultó para el 18G3 conjugado con iPr-caliqueamicina ("iPr") se resumen en la Tabla 6. Los resultados del ensayo de citotoxicidad que resultaron para el
20 18G3 conjugado con CTI (glucurónido) se resumen en la Tabla 7.

Tabla 6: Valores de IC50 del ADC de CD123-iPr en células de AML.

	IC50 (ng/mL) en células de AML	
Línea celular	MOLM13	MV4-11
Nivel de expresión de CD123	+++	+++
18G 3- iPr	0.05075 ± 0.01	0.125 ± 0.06
Neg 8.8 -iPr	96.23	>100

Tabla 7: Valores de IC50 del ADC de CD123-CTI en células de AML.

	IC50 (ng/mL) en células de AML						
Línea celular	MOLM13	MV411	Granta519	JVM3	OCI-AML3	NB4	HL60
Nivel de expresión de CD123	+++	+++	++	++	+	+	-
18G3-CTI	0.33 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.26 ± 0.04	1.3 ± 0.36	2.58 ± 0.6	38.60 ± 9.18	>100 ± 0
Neg.8.8-CTI	>100 ± 0	84.96 ± 15.04	>100 ± 0	>100 ± 0	>100 ± 0	>100 ± 0	>100 ± 0

Estos datos demuestran que el ADC de CD123 con un DAR de ~2 son activos e inducen la muerte celular en líneas celulares de cáncer que expresan CD123, pero que son inactivas en células que no expresan CD123. Esto demuestra la potencia y especificidad de estos ADC.

Ejemplo 2: Ruta de señalización de interleucina-3 (IL-3) y

citotoxicidad de los anticuerpos de CD123 y ADC

Este ejemplo ilustra la capacidad de los anticuerpos de CD123 para bloquear la señalización de IL-3 y citotoxicidad de ADC de CD123.

5 Este estudio se llevó a cabo para determinar si cualquiera de los clones del anticuerpo de CD123 se une de forma competitiva a los sitios de unión de IL-3 en células TF-1 que expresan CD123/IL-3R α . Las células TF-1 que expresan CD123/IL-3R α se coincubaron con 20 ng/ml de IL-3 y los
10 siguientes anticuerpos de CD123: 3D1, 18G3 y 16D6 con dosis a 100 ng/ml, 25 ng/ml, 6.25 ng/ml, 1.56 ng/ml, 0.39 ng/ml, 0.09 ng/ml, 0.024 ng/ml, 0.006 ng/ml, 0.002 ng/ml y 0.0004 ng/ml. El anticuerpo de CD123 7G3 se utilizó como un anticuerpo de referencia que se ha mostrado bloquea la ruta de señalización
15 de IL-3 y el anticuerpo Neg 8.8 se utilizó como un control negativo. Para la supervivencia celular CTG de medición del ensayo, las células se trataron durante cuatro días a 37°C. Después del período de tratamiento, las células se recolectaron y se prepare la proteína. STAT5, STAT5
20 fosforilado y los niveles de actina se analizaron al utilizar el análisis de transferencia Western. Los resultados de la transferencia Western se muestran en la FIGURA 1.

La presencia de la proteína fosforilada STAT5 de señalización corriente abajo ("Fosfo-Stat5") indica la activación de la ruta de señalización de IL-3. El tratamiento de las células TF-1 con IL-3 sola o IL-3 más el anticuerpo de control Neg.8.8 ("8.8") active la señalización de IL-3 como se muestra por la presencia de Fosfo-Stat5 (FIGURA 1). El tratamiento con el anticuerpo de CD123 7G3 bloquea la señalización de IL-3. El anticuerpo 3D1 de CD123 también bloquea esta trayectoria. En contraste, los anticuerpos 18G3 y 16D6 de CD123 no bloquearon la fosforilación STAT5 mediada por IL-3.

Las citotoxicidades de CD123-18G3-CPI y CD123-16D6-CPI todavía se mantuvieron en presencia de IL-3 (Tabla 8).

15

Tabla 8

20

Línea celular	IL-3 (ng/ml)	IC50 (ng/mL) en células de AML		
		Neg.8.8-CPI	CD123-18G3-CPI	CD123-16D6-CPI
MOLM13	0	44.24 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.23 ± 0.0
MOLM13	0.3	42.93 ± 0.0	0.12 ± 0.0	0.23 ± 0.0
MOLM13	1	28.38 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.19 ± 0.0
MV4-11	0	>200	1.07 ± 0.0	1.25 ± 0.0
MV4-11	0.3	>200	1.05 ± 0.0	1.13 ± 0.0
MV4-11	1	>200	0.21 ± 0.0	1.13 ± 0.0

Ejemplo 3: Eficacia *in vivo* del ADC de CD123

Este ejemplo ilustra la eficacia del ADC de CD123 *in vivo*.

La actividad anti-tumor del ADC de CD123 se probó *in vivo* al utilizar modelos de xenoinjerto de la línea celular de leucemia mieloide aguda (AML). Para cada modelo descrito a continuación, la primera dosis se dio en el Día 0. Los tumores se midieron al menos una vez a la semana y su volumen se calculó con la fórmula: volumen de tumor (mm³) = 0.5 x (ancho del tumor²) (longitud del tumor). Los volúmenes medios de tumor (± E.E.M.) para cada grupo de tratamiento se calcularon para incluirse al tener 10 animales. Todos los experimentos con animales se condujeron en una instalación acreditada por la Asociación para la Evaluación del Cuidado de Animales de Laboratorio según los lineamientos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de los Animales y aprobación de la investigación apropiada con animales. El ADC de CD123 demostró una alta eficacia en las líneas celulares con mutaciones génicas clasificadas o genes sobreexpresados y/o proteínas de una manera dependiente de la dosis.

A. Xenoinjertos H.1 MOLM13 de AML

La actividad anti-tumor de ADC de CD123 se examinó en ratones NOD/SCID inmunodeficientes en el crecimiento *in vivo* de tumores de humano. Para modelos de AML subcutáneos (sc), se implantaron vía subcutánea 5×10^6 células MOLM13 en el flanco de ratones hembra. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 200 mm^3 , los animales se pusieron en etapas para asegurar la uniformidad del tamaño del tumor entre los diversos grupos de tratamiento. El modelo de xenoinjerto subcutáneo en MOLM13 de AML se dosificó vía intravenosa cuatro veces cada cuatro días (Q4dx4) con un vehículo PBS, CD123-CPI (18G3, 16D6 o 3D1) a 0.3 mg/kg o 1 mg/kg o control Neg-8.8-CPI a 0.3 mg/kg o 1 mg/kg. Los datos se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9

[illegible]

Día 33	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2015 ± 487	0 ± 0
Día 40	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2703 ± 590	0 ± 0
Día 48	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0
Día 54	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0
Día 54	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0
Día 60	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0

El tumor CD123-CPI se inhibió significativamente y comparó con Neg.8.8-CPI (Tabla 9). A una dosis de 0.3 mg/kg, los tres ADC de CD123: 18G3-CPI, 16D6-CPI y 3D1-CPI fueron citotóxicos. Para el día 17, diez de los diez animales en cada grupo mostraron una regresión del tumor. Todos estos ratones permanecieron libres de tumor al menos hasta el día 60 en el cual entonces se terminó el estudio. A una dosis de 1 mg/kg de ADC de CD123, la regresión del tumor apareció de forma más temprana para el día 12.

Estos datos demuestran que CD123-CPI inhibió el crecimiento de los tumores de xenoinjerto MOLM13 de AML.

Para probar la eficacia de ADC de CD123 a dosis menores, se realizó un estudio de eficacia *in vivo* al

utilizar el mismo modelo de MOLM13. Los animales se trataron como se describió anteriormente. Como se muestra a continuación en la Tabla 10, los CD123-CPI a 0.1 mg/kg, inhibieron de forma muy efectiva el crecimiento del tumor en todos los ratones y de manera dependiente de la dosis (Tabla 10, columnas centrales "18G3-CPI" y "16D6-CPI"). En contraste, los tumores en los ratones tratados con Neg. 8.8-CPI continuaron creciendo (Tabla 10, columna derecha "Neg 8.8-CPI").

Tabla 10

Xenoinjertos L, volumen medio de tumor (mm ³ +/- EEM)										
Q4dx4	PBS	CD123 -CPI						Neg 8.8- CPI		
		18G3-CPI			16D6-CPI			Control		
dosis → (mg/kg)	0	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3
Día 0	177 ± 10	187 ± 14	183 ± 15	181 ± 11	184 ± 13	181 ± 12	182 ± 9	181 ± 15	183 ± 14	188 ± 24
Día 4	551 ± 47	199 ± 21	147 ± 21	112 ± 14	226 ± 22	178 ± 20	87 ± 9	494 ± 43	324 ± 56	209 ± 50
Día 9	1614 ± 125	120 ± 19	40 ± 13	4 ± 4	169 ± 27	51 ± 13	0 ± 0	1530 ± 123	1060 ± 159	157 ± 38

5

10

15

20

Día 11	2216 ± 149	110 ± 29	13 ± 10	0 ± 0	217 ± 52	10 ± 10	0 ± 0	2075 ± 79	1253 ± 170	78 ± 25
Día 14	-	112 ± 45	0 ± 0	0 ± 0	371 ± 94	0 ± 0	0 ± 0	-	2217 ± 219	77 ± 31
Día 16	-	106 ± 49	0 ± 0	0 ± 0	411 ± 104	0 ± 0	0 ± 0	-	1749 ± 280	38 ± 23
Día 22	-	385 ± 143	0 ± 0	0 ± 0	1319 ± 275	0 ± 0	0 ± 0	-	-	147 ± 67
Día 25	-	859 ± 308	0 ± 0	0 ± 0	1470 ± 344	0 ± 0	0 ± 0	-	-	356 ± 136
Día 29	-	720 ± 273	0 ± 0	0 ± 0	1948 ± 653	0 ± 0	0 ± 0	-	-	865 ± 298
Día 31	-	805 ± 349	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	-	-	577 ± 251
Día 37	-	927 ± 653	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	-	-	1154 ± 352
Día 42	-	747 ± 747	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	-	-	2363 ± 158
Día 47	-	-	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-
Día 53	-	-	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-
Día 57	-	-	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-
Día 65	-	-	0 ± 0	0 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	-	-	-

Para probar la eficacia de CD123-18G3-CTI, se realizó un estudio de eficacia *in vivo* al utilizar el mismo modelo MOLM13. Los animales se trataron como se describe anteriormente. Como se muestra en la Tabla 11, el tratamiento con CD123-18G3-CTI inhibió el crecimiento de tumor en los ratones de manera dependiente de la dosis. En contraste, los tumores en los ratones tratados con Neg. 8.8-CTI continuaron creciendo.

Tabla 11

	Xenoinjertos MOLM-13 de AML, volumen medio de tumor (mm ³ +/- EEM)								
Q4dx4	Neg.8.8-CTI		CD123-18G3-CTI (Glucurónido)			CD123-18G3-CTI (Galactósido)			
DOSIS (mg/kg)	0.1 (Glu)	0.3 (Gal)	0.01	0.03	0.1	0.01	0.03	0.1	0.3
Día -1	207 ± 12	213 ± 12	205 ± 11	211 ± 9	213 ± 11	208 ± 8	202 ± 7	209 ± 14	213 ± 15
Día 5	698 ± 46	805 ± 67	702 ± 41	640 ± 48	358 ± 32	808 ± 88	688 ± 46	391 ± 30	320 ± 34
Día 8	1264 ± 80	1304 ± 106	1215 ± 71	834 ± 77	307 ± 27	1500 ± 113	1191 ± 85	354 ± 33	248 ± 31
Día 12	2551 ± 117	2062 ± 142	2338 ± 118	1196 ± 133	147 ± 17	-	2165 ± 160	278 ± 27	127 ± 17
Día 15	-	-	-	1214 ± 128	61 ± 6	-	-	175 ± 21	59 ± 14

5	Día 19	-	-	-	1583 ± 192	38 ± 12	-	-	142 ± 28	13 ± 8
	Día 22	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	115 ± 36	18 ± 12
	Día 26	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	194 ± 58	0 ± 0
	Día 29	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	266 ± 93	0 ± 0
	Día 36	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	635 ± 194	0 ± 0
10	Día 39	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	906 ± 254	0 ± 0
	Día 42	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	-	0 ± 0
	Día 49	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	-	0 ± 0
	Día 54	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	-	0 ± 0
15	Día 60	-	-	-	-	0 ± 0	-	-	-	0 ± 0

B. Xenoinjertos H.2 MV4-11 de AML

El efecto de ADC de CD123 en el crecimiento de los tumores de humano se evaluó al utilizar ratones innodeficientes. Para modelos de AML subcutáneos (sc), se implantaron vía subcutánea 5×10^6 células MV4-11 en el costado de ratones NOD-SCID hembra. Cuando los tumores

alcanzaron un volumen promedio de 200 mm³, los animales se pusieron en etapas para asegurar la uniformidad del tamaño de tumor entre los diversos grupos de tratamiento. Los animales con xenoinjerto MV4-11 subcutáneo de AML se dosificaron vía intravenosa cuatro veces cada cuatro días (Q4dx4) con vehículo de PBS, CD123-CPI o 8.8-CPI en las siguientes dosis: 0.1, 0.3 y 0.6 mg/kg. Los datos se resumen en la Tabla 12. El CD123-18G3-H16-CPI se comparó con Neg 8.8-CPI y con vehículo de PBS.

La dosis de 0.6 mg/kg de CD123-CPI fue el ADC más potente probado en este estudio y para el día 65, diez de los diez animales todavía permanecieron en el estudio libres de tumor. Incluso con la dosis de 0.3 mg/kg, nueve de los diez ratones mostraron la regresión del tumor alrededor del día 25 y permanecieron libres de tumor hasta que el estudio terminó en el día 65. Los datos demuestran que CD123-CPI inhibe el crecimiento de los tumores de xenoinjerto MV4-11.

Tabla 12

q4dx4	Xenoinjertos MV4-11 de AML, volumen medio de tumor (mm ³ +/- EEM)						
	PBS	CD123-18G3-H16-CPI			Neg 8.8-H16-CPI		
DOSIS (mg/kg)	0	0.1	0.3	0.6	0.1	0.3	0.6
Día 0	235 ± 14	236 ± 17	232 ± 13	232 ± 15	236 ± 9	233 ± 11	228 ± 12
Día 3	373 ± 19	225 ± 19	183 ± 11	174 ± 16	310 ± 20	289 ± 13	204 ± 16
Día 8	579 ± 62	142 ± 15	114 ± 9	101 ± 7	509 ± 41	230 ± 39	118 ± 11
Día 11	961 ± 112	161 ± 24	98 ± 9	79 ± 7	767 ± 72	289 ± 55	107 ± 16
Día 15	1876 ± 200	189 ± 63	70 ± 18	57 ± 12	1428 ± 157	395 ± 77	60 ± 20
Día 18	1781 ± 467	226 ± 84	60 ± 17	57 ± 12	1773 ± 136	615 ± 123	77 ± 23
Día 21	-	392 ± 144	96 ± 23	67 ± 14	2560 ± 220	954 ± 186	112 ± 32
Día 25	-	729 ± 271	111 ± 56	49 ± 20	-	1632 ± 230	168 ± 87
Día 28	-	626 ± 337	125 ± 101	67 ± 30	-	1684 ± 688	301 ± 150
Día 32	-	215 ± 197	208 ± 183	113 ± 79	-	1645 ± 677	431 ± 197
Día 36	-	385 ± 367	40 ± 16	198 ± 177	-	1541	494 ± 129
Día 39	-	0 ± 0	21 ± 11	265 ± 249	-	1901	603 ± 153
Día 44	-	15 ± 15	29 ± 12	31 ± 15	-	-	1346 ± 348
Día 51	-	0 ± 0	20 ± 10	32 ± 18	-	-	711 ± 411
Día 58	-	40 ± 23	20 ± 10	27 ± 13	-	-	1450 ± 818
Día 65	-	0 ± 0	9 ± 6	19 ± 10	-	-	
Día 73		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0			

Para probar la eficacia de CD123-CTI, se realiza un estudio de eficacia *in vivo* al utilizar el mismo modelo MV4-11. Los animales se trataron como se describe anteriormente. Como se muestra en la Tabla 13, CD123-CTI también inhibió el crecimiento de tumor en los ratones de una manera dependiente de la dosis mientras que los tumores tratados con Neg. 8.8-

CTI continuaron creciendo.

Tabla 13

	Xenoinjertos MV4-11 de AML, volumen medio de tumor (mm ³ +/- EEM)							
Q4dx4	Neg.8.8-CTI		CD123-18G3-CTI (Glucurónido)			CD123-18G3-CTI (Galactósido)		
DOSIS (mg/kg)	0.3 (Glu)	0.3 (Gal)	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3
Día -1	229 ± 14	232 ± 10	235 ± 21	232 ± 11	235 ± 14	233 ± 11	232 ± 14	229 ± 13
Día 4	307 ± 18	301 ± 18	299 ± 28	221 ± 15	189 ± 9	270 ± 23	260 ± 14	216 ± 18
Día 7	361 ± 37	408 ± 49	468 ± 37	193 ± 10	122 ± 9	333 ± 19	214 ± 23	163 ± 12
Día 12	458 ± 58	759 ± 74	804 ± 85	215 ± 30	96 ± 12	625 ± 52	325 ± 52	121 ± 25
Día 15	513 ± 57	868 ± 78	1165 ± 128	214 ± 35	83 ± 14	873 ± 86	425 ± 68	114 ± 25
Día 18	640 ± 85	1367 ± 179	1551 ± 107	229 ± 43	75 ± 11	1348 ± 104	519 ± 88	96 ± 19
Día 21	867 ± 108	1970 ± 227	2263 ± 90	311 ± 60	94 ± 19	2140 ± 162	716 ± 124	86 ± 20
Día 25	1264 ± 179	-	-	391 ± 85	50 ± 14	-	900 ± 170	70 ± 16
Día 28	1497 ± 159	-	-	484 ± 99	73 ± 16	-	1192 ± 251	64 ± 16

5

10

15

20

Día 32	-	-	-	627 ± 121	107 ± 19	-	-	82 ± 21
Día 35	-	-	-	771 ± 144	89 ± 17	-	-	92 ± 21
Día 40	-	-	-	1056 ± 205	65 ± 16	-	-	74 ± 24
Día 43	-	-	-	-	46 ± 11	-	-	113 ± 44
Día 47	-	-	-	-	58 ± 10	-	-	135 ± 72
Día 50	-	-	-	-	67 ± 12	-	-	198 ± 107
Día 54	-	-	-	-	49 ± 9	-	-	339 ± 210
Día 61	-	-	-	-	61 ± 8	-	-	337 ± 273
Día 70	-	-	-	-	41 ± 7	-	-	-
Día 78	-	-	-	-	23 ± 7	-	-	-
Día 84	-	-	-	-	35 ± 8	-	-	-
Día 92	-	-	-	-	16 ± 6	-	-	-
Día 99	-	-	-	-	11 ± 5	-	-	-

Estos resultados demuestran que el ADC de CD123 son altamente eficaces en los tumores tratados.

Ejemplo 4: Eficacia *in vivo* del ADC de CD123

5 Este ejemplo ilustra la eficacia del ADC de CD123 *in vivo* utilizando xenoinjertos diseminados derivados del AML del paciente (PDX de AML).

La potencia de CD123-CPI se examinó en ratones inmunodeficientes sobre el crecimiento *in vivo* en un modelo
10 diseminado establecido con células de médula ósea del paciente obtenidas de acuerdo con los procedimientos de consentimiento apropiados. La Tabla 14 proporciona un resumen de las muestras del paciente utilizadas en este estudio.

Tabla 14

15

Modelo	Riesgo	Subtipo	Anormalidad	Citogenética
PDX2407	Pobre, reincidió	M2	FLT3-ITD	46, XY
PDX0407	Intermedio	M2	NPM-1 FLT3-ITD	46, XY
CTG 2226	Pobre, refractario	M4	FLT3-ITD Citogenética	46,XY,add(6)(p21),del(8)(p21),add(12)(q24.1)[13]/46,XY,del(1)(q32),del(7)(q22q32),der(6;12)(q10;p10),add(22)(q?11.2),+mar[3]/45,XY,t(1;2)(p?22;q11.2),-21[1]/46,XY[3]

20

CTG 2229	Pobre, refractario	M1	Citogenética	46,XY,del(2)(p13p?23),t(4;13)(q31;q34),add(4)(q?25),del(6)(q13q25),t(9;22)(q34;q11.2),del(10)(q24),add(16)(q24)[20]
CTG 2235	Intermedio, de nuevo	AML-MLD	Citogenética	46,XY,del(20)(q11.2q13.1)[20]
CTG 2238	Pobre De nuevo	No seleccionado	FLT3-ITD	No disponible
CTG2240	Intermedio, De nuevo	AML-MLD	Citogenética	46,XY,t(9;11)(p22;q23),?add(10)(q?24)[5]/46,XY[5]
50170	Pobre,reincidente	M1	FLT3-ITD	46, XY
50102	Favorable	Ambiguo	No detectado	No detectado

10

Para los estudios, se inyectaron vía intravenosa 1.0×10^6 células de médula ósea del paciente en la vena caudal lateral de ratones NSG irradiados. El estudio se colocó en etapas y se aleatorizó con base en la colocación de injertos de células CD45+/CD123+/CD33+ de humano (12-55% en la sangre periférica como se mide mediante la tinción citométrica de flujo). Los ratones PDX de AML se dosificaron vía intravenosa 2 veces cada siete días (Q7dx2) con el vehículo de PBS o 18G3-CPI. Alrededor de 3-5 días después de la segunda/última dosis, la sangre periférica y la médula ósea se cosecharon a partir de los ratones sacrificados. Las células de tumor que permanecieron en la médula ósea y la

sangre de los animales sacrificados se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se resumen en la gráfica de la FIGURA 2 y la Tabla 15. En la Tabla 15, los números representan el porcentaje de células de tumor en reposo en la sangre periférica y médula ósea.

Cada estudio tuvo aproximadamente de 6 a 10 ratones por grupo. Los datos demuestran que el ADC de CD123 es eficaz para reducir las cantidades de las células de tumor tanto en sangre periférica como en médula ósea de una manera dependiente de la dosis (FIGURA 2 y Tabla 15).

Tabla 15

Modelo	Dosis CD123-CPI	Sangre periférica	Médula ósea
	mg / kg	% tratadas/ % de vehículo (% ± EEM)	% tratadas/ % de vehículo (% ± EEM)
PDX2407	0.1	0.56 ± 0.1 / 88 ± 1.1	3.04 ± 0.7 / 90 ± 2
	0.5	0.3 ± 0.05 / 88 ± 1.1	0.14 ± 0.03 / 90 ± 2
PDX0407	0.03	1.1 ± 0.2 / 29 ± 4.8	1.3 ± 0.4 / 30 ± 14
	0.1	0.16 ± 0.04 / 29 ± 4.8	0.8 ± 0.3 / 30 ± 14
CTG 2226	0.03	1.5 ± 0.4 / 21 ± 2	18 ± 1.9 / 77 ± 7.4
	0.1	0.9 ± 0.3 / 22 ± 2	8 ± 1.6 / 77 ± 7.4
CTG 2229	0.03	54 ± 9 / 65 ± 3.2	83 ± 6.9 / 84 ± 6
	0.1	16 ± 2.5 / 65 ± 3.2	50 ± 9.7 / 84 ± 6
CTG 2235	0.03	1.8 ± 0.6 / 31 ± 6	73 ± 6.1 / 83 ± 4.5
	0.1	0.7 ± 0.23 / 31 ± 6	59 ± 6.3 / 83 ± 4.5

5

CTG 2238	0.03	$5.8 \pm 0.7 / 32 \pm 2$	$45 \pm 9.7 / 95 \pm 0.6$
	0.1	$1.7 \pm 0.5 / 32 \pm 2$	$12 \pm 1.6 / 95 \pm 0.6$
CTG2240	0.03	$1 \pm 0.4 / 52 \pm 2.9$	$60 \pm 12 / 99 \pm 0.1$
	0.1	$0.2 \pm 0.07 / 52 \pm 2.9$	$16 \pm 6.7 / 99 \pm 0.1$
PDX 50170	0.03	$0.4 \pm 0.1 / 14 \pm 1.4$	$24 \pm 7.3 / 46 \pm 9.6$
PDX 50120	0.03	$53 \pm 0.8 / 58 \pm 0.8$	$83 \pm 1.9 / 77 \pm 2.6$
	0.1	$40 \pm 4.2 / 58 \pm 0.8$	$83 \pm 4.7 / 77 \pm 2.6$
	0.3	$31 \pm 2.4 / 58 \pm 0.8$	$78 \pm 1.9 / 77 \pm 2.6$

Para determinar si CD123-18G3-CPI puede incrementar la supervivencia global de los ratones que portan el tumor, se realizó un estudio de supervivencia al utilizar PDX2407 cuando la sangre periférica mostró una alta colocación del injerto, es decir, ~32% en promedio. Los ratones se dosificaron vía intravenosa 2 veces cada siete días (Q7dx2) con vehículo de PBS o CD123-CPI y se monitorearon diariamente. Cuando un ratón mostró signos clínicos, tales como letargo y pérdida de peso (siguiendo la Asociación de Animales para la Evaluación del Cuidado de Animales de Laboratorio en virtud de los lineamientos del Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales) el ratón se sometió a eutanasia.

Los resultados se resumen en la gráfica de la FIGURA 3. El tratamiento con CD123-18G3-CPI prolonga la supervivencia global de los animales que portan el tumor de

una manera dependiente de la dosis. Específicamente, el tratamiento con CD123-18G3-CPI a una dosis de 0.1 mg/kg extendió la supervivencia por aproximadamente 25% y el tratamiento con CD123-18G3-CPI a una dosis de 0.3 mg/kg duplicando aproximadamente la longitud de la supervivencia (FIGURA 3).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con un ADC de CD123 induce la regresión e inhibe el avance de AML y prolonga la supervivencia.

10

Ejemplo 5: Preparación del Conjugado de Anticuerpo-Fármaco (ADC) de CD123

Este ejemplo ilustra la conjugación y preparación de h18G3-AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI-000638314, un ADC de CD123, también denominado en la presente como "18G3-CPI" o "CD123-18G3-CPI".

El 18G3-CPI es un ADC comprendido de un mAb 18G3 humanizado con CD123 (ver Tablas 2.0 y 2.1, *supra*, "h18G3"), el enlazador AcLysValCitPABC y agente de ciclopropilpirroloindolina (CPI). Las mutaciones K222R, E295L, Q295L, Y296Q, N297G se introdujeron en la bisagra superior y Fc para permitir la conjugación específica del

20

sitio del agente de CPI catalizado mediante transglutaminasa. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo de IgG1 humanizado CD123-18G3-H16-N60G-K222R (denominado en la presente como "h18G3") son como sigue:

Cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLSSGTRKNILAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSYNLYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
10 LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO.: 30).

Cadena pesada:

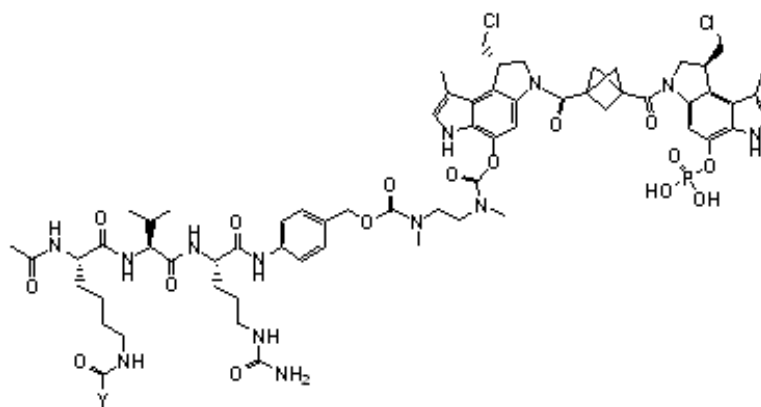
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTSGDISWVRQAPGKGLEWVAVIWSGGGTNYGS
RLMSRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGNFYFDYWGGQTLTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
15 SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRELLQGSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO.: 27).

20 La secuencia de mutación específica del sitio H16 está en cursiva y negritas anteriormente e incluye cinco mutaciones K222R (en la bisagra), E294L, Q295L, Y296Q y N297G

de transglutaminasa específica del sitio H16. La secuencia LLQG es la etiqueta de reconocimiento para transglutaminasa y el agente enlazador se conjuga en Q296. G en CDR-H2 (subrayado) es una mutación N60G.

5 El agente enlazador, AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI, se conjuga específicamente en el sitio en el aminoácido Q296. La estructura del agente enlazador AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI-000638314 se muestra a continuación:

10



15 El h18G3 se conjugó con el agente enlazador AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI-000638314 mediante el uso de transglutaminasa bacteriana (Sigma, 45U/mg de proteína). En particular, el anticuerpo se intercambió en amortiguador que contenía KPO4 100 mM, NaCl 200 mM, pH 7. El agente enlazador
20 se agregó en un exceso molar de 10 veces al anticuerpo en presencia de sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 7.5% (v/v). La reacción enzimática se inició mediante la adición de 1U de

transglutaminasa bacteriana por mg de anticuerpo y se incubó a 25°C durante la noche con mezclado continuo.

La mezcla de reacción se incubó con alcohol isopropílico al 15% durante 30 min a temperatura ambiente. 5 Entonces se diluyó en 4 volúmenes de amortiguador de KPO4 1M y se purificó mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) utilizando una columna HP de butil-Sefarosa (GE Lifesciences). El método utilizó KPO4 1 M, Tris 50 mM, pH 7 para unirse y el ADC se eluyó con Tris 50 mM, pH 7 durante 10 10 CV. El compuesto purificado por HIC se dializó en un regulador final de Histidina 20 mM, 85 mg/mL de sacarosa, pH 5.8. El ADC además se caracterizó mediante SEC para la pureza y cromatografía de fase inversa para calcular la relación de fármaco-anticuerpo. La concentración de proteína se determinó 15 mediante el espectrofotómetro UV.

El anticuerpo inicial tuvo una expresión muy buena de hasta 700 mg/L como se evaluó en los grupos de CHO, 88% producido recuperado y 99% de pureza después de tres pasos de purificación. El 18G3 se desempeñó muy bien en las 20 conjugaciones como se evaluó al lograr un DAR de 1.9-2.0 y 55-60% de conjugación producida después de la purificación. El ADC resultante, CD123-18G3-H16-N60G-K222R-hG1-

(Q)AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI, mostró Buena estabilidad térmica e integridad molecular.

Ejemplo 6: Métodos para conjugar el anticuerpo a

5 AcLysValCitPABC-DMAE-CO CPI-000638314 utilizando
transglutaminasa

Este ejemplo ilustra la conjugación del anticuerpo al agente enlazador AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI-000638314, también denominado en la presente como AcLysPABC-CPI-8314.

10 *Conjugación el agente enlazador citotóxico de CPI.*

La conjugación de AcLysPABC-CPI-8314 (estructura mostrada anteriormente en el Ejemplo 5) en el sitio H16 de un anticuerpo se optimizó al hacer variar una variedad de parámetros diferentes, tales como la molaridad y composición
15 salina, pH, concentración enzimática, tiempo y temperatura (Tabla 16). En breve, el anticuerpo se amortiguó intercambiado en el amortiguador y pH apropiados en cada una de las condiciones mostradas en la Tabla 16. Se agregó un exceso molar de 10 veces del agente enlazador AcLysPABC-CPI-
20 8314 al anticuerpo y se agregó sulfóxido de dimetilo al 5-10% para solubilizar el agente enlazador en la mezcla de reacción. Después de la adición de transglutaminasa

bacteriana (0.5-5 U/mg del anticuerpo), la mezcla de reacción se mezcló de forma continua durante un tiempo y temperatura estipulados. El agente enlazador sin reaccionar y la enzima transglutaminasa se retiraron ya sea mediante cromatografía de exclusión de tamaños y/o cromatografía de interacción hidrofóbica. La relación fármaco-anticuerpo se calculó mediante LCMS o RP-HPLC.

La eficiencia de la conjugación se midió mediante la relación anticuerpo-fármaco (DAR) para las diversas condiciones que se muestran en la Tabla 16. Por ejemplo, cuando el anticuerpo se intercambió en el regulador que contenía KPO4 30 mM, NaCl 150 mM a pH 7, se logró una DAR de 1.6.

Los anticuerpos dirigidos a CD33, CD123, Her2, PRLR, CD22 y otros antígenos, incluyen antígenos que se han conjugado con el agente enlazador AcLysValCitPABC-DMAE-CO_CPI-000638314 al utilizar estas condiciones optimizadas.

Tabla 16

Resistencia iónica del amortiguador	Concentración de NaCl, mM	pH	Unidades TG /mg de Ab	Relación Fármaco-Anticuerpo (DAR)
NaAc 20 mM	75	5.8	1	0.3
KPO ₄ 30 mM	150	6.5	1	1.3
KPO ₄ 30 mM	150	7.0	0.5	1.6
KPO ₄ 30 mM	150	7.0	2	1.6
KPO ₄ 30 mM	150	7.0	5	1.4
KPO ₄ 30 mM	150	7.5	1	1.5
KPO ₄ 30 mM	150	8.0	1	0.6
Tris 25 mM	150	8.0	1	0.6

5

Aunque las enseñanzas descritas se han descrito con referencia a diversas aplicaciones, métodos, kits y composiciones, se apreciará que pueden hacerse diversos cambios y modificaciones sin apartarse de las enseñanzas de la presente y la invención reivindicada siguiente. Los ejemplos anteriores se proporcionan para ilustrar mejor las enseñanzas descritas y no pretenden limitar el alcance de las enseñanzas presentadas en la presente. Mientras que las enseñanzas presentes se han descrito en términos de estas modalidades ejemplares, el técnico experimentado entenderá fácilmente que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estas modalidades ejemplares sin la experimentación indebida. Todas de tales variaciones y modificaciones están dentro del alcance de las enseñanzas actuales.

20

Todas las referencias citadas en la presente, incluyendo patentes, solicitudes de patente, documentos,

libros de texto y similares y las referencias citadas en la presente en el grado en el que no están listos, se incorporan en la presente para referencia en su totalidad. En el caso de que una o más de la literatura incorporada y los materiales
5 similares difieran de o contradigan esta solicitud, incluyendo pero no limitados a los términos definidos, utilidad del término, técnicas descritas o similares, esta solicitud controla.

La descripción y ejemplos anteriores detallan
10 ciertas modalidades específicas de la invención y describen el mejor modo contemplado. Sin embargo, se apreciará que no importa cómo pueda aparecer en el texto detallado lo anterior, la invención puede practicarse de muchas maneras y la invención deberá interpretarse de acuerdo con las
15 reivindicaciones anexas y cualesquier equivalentes de las mismas.