

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 839**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2007 E 07712963 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 1999152**

54 Título: **Miembro de unión para el receptor GM-CSF**

30 Prioridad:

27.03.2006 US 786569 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2013

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)
MILSTEIN BUILDING GRANTA PARK
CAMBRIDGE CAMBRIDGESHIRE CB21 6GH, GB y
ZENYTH OPERATIONS PTY. LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COHEN, EMMA SUZANNE;
MINTER, RALPH RAYMOND;
HARRISON, PAULA ROSAMUND;
SLEEMAN, MATTHEW ALEXANDER;
NASH, ANDREW DONALD y
FABRI, LOUIS JERRY**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 395 839 T3

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

DESCRIPCIÓN

Miembro de unión para el receptor GM-CSF

5 La presente invención se refiere a los miembros de unión para la cadena alfa del Receptor del Factor de Estimulación de la Colonia de Granulocito/Macrófago (GM-CSFR α), especialmente las moléculas de anticuerpo anti-GMCSFR α . Además se refiere al uso de estos miembros de unión en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, respiratorias y autoinmunes mediadas a través de GMCSFR α , que incluyen la artritis reumatoide, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la esclerosis múltiple.

10 El GM-CSF es una citocina proinflamatoria de tipo I, que mejora la supervivencia, la proliferación y/o la diferenciación de una amplia gama de tipos de células hematopoyéticas que incluyen los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y sus células progenitoras. El receptor GM-CSF es un miembro de la superfamilia del receptor de la hematopoyetina. Es heterodimérico, consistente de una subunidad alfa y una beta. La subunidad alfa es altamente específica para el GM-CSF mientras que la subunidad beta es compartida con otros receptores de citocinas, que incluyen la IL3 y la IL5. Esto se refleja en una
15 distribución tisular más amplia de la subunidad beta del receptor. La subunidad alfa, GM-CSFR α , se expresa principalmente en las células mieloides y las células no hematopoyéticas, tales como los neutrófilos, los macrófagos, los eosinófilos, las células dendríticas, las células endoteliales y las células epiteliales respiratorias. El GM-CSFR α de longitud completa es una glicoproteína de membrana de tipo I de 400 aminoácidos que pertenece a la familia de receptores de citocinas de tipo I, y consiste de un péptido señal de 22 aminoácidos (posiciones 1-22), un dominio extracelular de 298 aminoácidos (posiciones 23-320), un dominio transmembrana de las posiciones 321 - 345 y un corto dominio intra-celular de 55 aminoácidos. El péptido señal se escinde para proporcionar la forma madura de GM-CSFR α como una proteína de 378 aminoácidos. Están disponibles los clones de ADNc de GM-CSFR α humano y murino y, a nivel de proteína, las subunidades del receptor tienen
20 36% de identidad. El GM-CSF es capaz de unirse con una afinidad relativamente baja a la subunidad α sola (Kd 1-5 nM) pero no en absoluto a la subunidad β sola. Sin embargo, la presencia de ambas subunidades α y β dan lugar a un complejo ligando-receptor de alta afinidad (Kd \approx 100pM). La señalización de GM-CSF se produce a través su unión inicial a la cadena α de GM-CSFR y después el entrecruzamiento con una subunidad más grande de la cadena β común para generar la interacción de alta afinidad, que fosforila la ruta JAK-STAT. La unión de GM-CSFR al GMCSF se examina en la ref.

30 [1]. Esta interacción además es capaz de señalizar a través de la fosforilación de tirosina y la activación de la ruta de la cinasa MAP.

Patológicamente, se ha demostrado que el GM-CSF desempeña un papel en la exacerbación de las enfermedades inflamatoria, respiratoria y autoinmune. La neutralización de la unión de GM-CSF al GM-CSFR α es por lo tanto un enfoque terapéutico para el tratamiento de las enfermedades y las afecciones mediadas a través de GM-CSFR.

35 Nicola y otros. [2] describieron un anticuerpo murino contra el GM-CSFR α humano, que se designó 2B7-17-A o "2B7", que se informó que tiene una afinidad relativamente alta por el GM-CSFR α humano y es un potente inhibidor de la acción biológica del GM-CSF humano en varios ensayos diferentes. El anticuerpo 2B7 está disponible comercialmente de Chemicon como MAB1037, y la ficha de especificaciones técnicas para el MAB1037 nota que este es un potente inhibidor de la acción biológica de GM-CSF. El 2B7 además se describió en WO94/09149.

40 Por medio del uso de una combinación de selecciones en las genotecas de fago scFv vírgenes, mutagénesis aleatoria y ensayos biológicos y bioquímicos diseñados adecuadamente (ver la Parte Experimental más abajo), se han identificado moléculas de anticuerpo muy potentes que se unen al GM-CSFR α humano e inhiben la acción de GM-CSF humano a su receptor. Los resultados presentados en la presente descripción indican que nuestros anticuerpos se unen a una región o epítipo diferente de GM-CSFR α comparado con el anticuerpo 2B7 anti-GM-CSFR α conocido, y sorprendentemente son aún más potentes que 2B7 como se demostró en una variedad de ensayos biológicos.

45 En consecuencia, esta invención se refiere a los miembros de unión que comprenden moléculas de anticuerpo que se unen al GM-CSFR α humano e inhiben la unión de GM-CSF humano al GM-CSFR α . Los miembros de unión de la invención pueden ser antagonistas de GM-CSFR. Los miembros de unión pueden ser inhibidores reversibles competitivos de la señalización de GM-CSF a través de GM-CSFR.

50 Los anticuerpos de la invención son especialmente útiles en la unión y neutralización de GM-CSFR α , y así son de uso en tratamientos para enfermedades mediadas por el GM-CSFR α , que incluyen las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como se indica por la experimentación contenida en la presente descripción y en la literatura técnica de apoyo adicional. Por ejemplo, se ha demostrado en ensayos basados en células que los anticuerpos de la invención son capaces de inhibir la

liberación de citocinas (por ejemplo, IL-6 y TNF α) inducida por la unión de GM-CSF natural a su receptor. Como se explica en más detalle más abajo, la inhibición de la actividad de GM-CSF mediante el bloqueo de la unión al GM-CSFR α es un enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades tales como la artritis reumatoide (RA), el asma, la inflamación de las vías respiratorias inducida por el humo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), la reacción alérgica, la esclerosis múltiple (MS), la leucemia mieloide y la aterosclerosis.

Los miembros de unión de acuerdo con la invención generalmente se unen al dominio extracelular de GM-CSFR α . En un aspecto de la invención, un miembro de unión se une a una secuencia Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln (YLDFQ), sec. con núm. de ident.: 201, en las posiciones 226 a 230 de GM-CSFR α humano maduro (sec. con núm. de ident.: 206). El miembro de unión puede unirse al menos a un residuo en la secuencia YLDFQ de GM-CSFR α humano, por ejemplo, se puede unir a uno, dos, tres o cuatro residuos de la secuencia YLDFQ. Así, el miembro de unión puede reconocer uno o más residuos dentro de esta secuencia, y opcionalmente puede unirse además a residuos flanqueantes adicionales o residuos estructuralmente vecinos en el dominio extra-celular de GM-CSFR α .

La unión se puede determinar por cualquier método adecuado, por ejemplo se puede usar una exploración de péptidos de unión, tal como un ensayo inmunoenzimático basado en PEPSCAN (ELISA), como se describe en detalle en otra parte en la presente descripción. En una exploración de péptido de unión, tal como el tipo que ofrecen los sistemas PEPSCAN, péptidos cortos superpuestos, que se derivan de los antígenos se examinan sistemáticamente para la unión a un miembro de unión. Los péptidos se pueden acoplar covalentemente a una superficie de apoyo para formar una matriz de péptidos. En resumen, una exploración de péptido de unión (por ejemplo, "PEPSCAN") incluye la identificación de (por ejemplo, por medio del uso del ELISA) un conjunto de péptidos a los cuales se une el miembro de unión, en donde los péptidos tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a los fragmentos de sec. con núm. de ident.: 206 (por ejemplo, los péptidos de aproximadamente 15 residuos contiguos de sec. con núm. de ident.: 206), y la alineación de los péptidos con el fin de determinar una huella de los residuos unidos por el miembro de unión, donde la huella comprende los residuos comunes a los péptidos superpuestos. De acuerdo con la invención, la huella identificada mediante la exploración de los péptidos de unión o PEPSCAN puede comprender al menos un residuo de YLDFQ correspondiente a las posiciones 226 a 230 de la sec. con núm. de ident.: 206. La huella puede comprender uno, dos, tres, cuatro o todos los residuos de YLDFQ. Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención se puede unir a un fragmento de péptido (por ejemplo, de 15 residuos) de sec. con núm. de ident.: 206 que comprende uno o más, preferentemente todos, los residuos de YLDFQ correspondientes a las posiciones 226 a 230 de la sec. con núm. de ident.: 206, por ejemplo, como se determina por un método de exploración de péptidos de unión o PEPSCAN descritos en la presente descripción. Así, un miembro de unión de la invención se puede unir a un péptido que tiene una secuencia de aminoácido de 15 residuos contiguos de la sec. con núm. de ident.: 206, en donde la secuencia de 15 residuos comprende al menos un residuo de, o al menos se superpone parcialmente con, YLDFQ en las posiciones 226 a 230 de la sec. con núm. de ident.: 206. Los detalles de un método de exploración de péptido de unión adecuado para determinar la unión se exponen en detalle en otra parte en la presente descripción. Otros métodos que son bien conocidos en la materia y se podrían usar para determinar los residuos unidos por un anticuerpo, y/o para confirmar los resultados de la exploración de péptidos de unión (por ejemplo, PEPSCAN), incluyen la mutagénesis dirigida al sitio, el intercambio deuterio hidrógeno, la espectrometría de masa, la NMR, y la cristalografía de rayos X.

Por consiguiente, un miembro de unión de la invención preferentemente neutraliza el GM-CSFR α . Neutralización significa la reducción o inhibición de la actividad biológica de GM-CSFR α , por ejemplo, reducción o inhibición de la unión de GM-CSF a GM-CSFR α , o de la señalización por el GM-CSFR α por ejemplo, según lo medido por las respuestas mediadas por el GM-CSFR α . La reducción o inhibición de la actividad biológica puede ser parcial o total. El grado en que un anticuerpo neutraliza el GM-CSFR α se refiere como su potencia neutralizante. La potencia se puede determinar o medir mediante el uso de uno o más ensayos conocidos por las personas con experiencia y/o como se describe o se refiere en la presente descripción. Por ejemplo, el miembro de unión puede tener una actividad de neutralización en uno o más de los siguientes ensayos:

- Ensayo bioquímico de unión al ligando
- Ensayo de proliferación de TF-1
- Ensayo del cambio de forma del granulocito humano
- Ensayo del cambio de forma del granulocito de primate cinomolgo no humano
- Ensayo de liberación de monocito TNF α
- Ensayo de supervivencia de granulocitos
- Ensayo de formación de colonias (inhibición de GM-CSF in vitro medió la diferenciación de progenitores de células sanguíneas)

- La inhibición de la bioactividad de GM-CSF in vivo por ejemplo, en ratones quiméricos con médula ósea transgénica que expresan el GM-CSFR humano
- Ensayo de liberación de citocina de célula mononuclear de sangre periférica

5 La potencia se expresa normalmente como un valor IC50, en pM a menos que declare de cualquier otra forma. En ensayos funcionales, IC50 es la concentración que reduce una respuesta biológica en un 50% de su máximo. En los estudios de unión al ligando, la IC50 es la concentración que reduce la unión al receptor en un 50% del máximo nivel de unión específica. La IC50 se puede calcular por la representación gráfica del % de la respuesta biológica máxima (representada por ejemplo, mediante la proliferación celular, que se puede medir como la incorporación de 3H timidina en cpm, en un ensayo de proliferación, por cambio de forma en un ensayo de cambio de forma, por la liberación de TNF α en un ensayo de liberación de TNF α , por la supervivencia en un ensayo de supervivencia, por número de colonias en un ensayo de formación de colonias, o por el aumento en el peso del bazo o disminución de la circulación de monocitos en ratones quiméricos con médula ósea transgénica que expresa el GM-CSFR humano en una prueba de bioactividad) o el % de unión específica al receptor como una función del log de la concentración del miembro de unión, y por medio del uso de un programa de software tal como el Prism (GraphPad) para adaptar una función sigmoideal a los datos para generar los valores de IC50.

15 Un valor IC50 puede representar la media de una pluralidad de mediciones. Así, por ejemplo, los valores IC50 pueden obtenerse a partir de los resultados de experimentos por triplicado, y después puede calcularse un valor IC50 promedio.

20 En el ensayo de proliferación de TF-1, los miembros de unión de la invención tienen normalmente un IC50 de menos que 1500 pM. Por ejemplo, la IC50 puede ser < 300, < 60, < 10, o < 1.5 pM, por ejemplo, aproximadamente 1.0 pM. Normalmente la IC50 es al menos 0.5 ó 1.0 nM. El anticuerpo murino 2B7 conocido tuvo una IC50 de aproximadamente 1600 pM en este ensayo. El ensayo de proliferación de TF-1 usado en la presente descripción fue con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de IC50 en el ensayo de proliferación de TF-1 representa la capacidad de un miembro de unión de inhibir la proliferación de células TF-1 inducidas por GM-CSF humano 7 pM. Para más detalle ver la sección de Materiales y Métodos de Ensayo.

25 Un miembro de unión de la invención puede tener un pA₂ más negativo que -6, -7, -8, -9, -10, -10.5 ó -11 en el ensayo de proliferación de TF-1. Por ejemplo, pA₂ puede ser aproximadamente -10.5 ó -11. El cálculo y significación de los valores pA₂ se discute en detalle en la Parte Experimental en Materiales y Métodos de Ensayo.

30 En el ensayo del cambio de forma del granulocito humano, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una IC50 de menos que 100 pM, por ejemplo menos que 50 pM o menos que 30, 25, 20, 15 ó 10 pM. Normalmente la IC50 es al menos 5, 6 ó 7 pM. El anticuerpo 2B7 murino en contraste es menos potente con una IC50 medido de 477 pM en este ensayo. El ensayo del cambio de forma del granulocito humano usado en la presente descripción fue con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de IC50 en el ensayo de cambio de forma del granulocito humano representa la capacidad de un miembro de unión de inhibir el cambio de forma de los granulocitos humanos inducidos por GM-CSF humano 7 pM. Para más detalle ver la sección de Materiales y Métodos de Ensayo.

35 En el ensayo de cambio de forma de los granulocitos de cinomolgo, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una IC50 menor que 20 pM, típicamente menor que 10, 5 o 2.5 pM. La IC50 puede ser al menos 0.5, 1 ó 1.5 pM. El anticuerpo murino 2B7 conocido tuvo una IC50 de 26 pM cuando se probó en este ensayo. El ensayo del cambio de forma de los granulocitos de cinomolgo usado en la presente descripción fue con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de IC50 en el ensayo de cambio de forma de granulocito de cinomolgo representa la capacidad de un miembro de unión de inhibir el cambio de forma de granulocitos de cinomolgos inducido por GM-CSF humano 7 pM. Para más detalle ver la sección de Materiales y Métodos de Ensayo.

40 Un miembro de unión de la invención puede tener un pA₂ más negativo que -6, -7, -8, -9, -10, -10.5 ó -11 en el ensayo de cambio de forma de humano y/o cinomolgo. Preferentemente el pA₂ es aproximadamente -10 ó -11.

45 En el ensayo de liberación de TNF α de monocitos, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una IC50 de menos que 150 pM, típicamente menor que 110 pM, por ejemplo, menor que 100pM. La IC50 puede ser al menos 30 ó 40 pM. El ensayo de liberación de TNF α de monocitos usado en la presente descripción fue con una concentración final de 1 nM de GM-CSF humano. Así, la potencia de neutralización de IC50 en el ensayo de liberación de TNF α de monocitos representa la capacidad de un miembro de unión de inhibir la liberación de TNF α a partir de monocitos humanos estimulados con GM-CSF humanos 1 nM. Para más detalle ver la sección de Materiales y Métodos de Ensayo.

En el ensayo de supervivencia de granulocitos, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una IC50 menor que 100pM, típicamente menor que 850 pM. La IC50 puede ser menor que 500, 250, 150, 100, 50, 30, 20 ó 10 pM. La IC50 puede ser al menos 5 pM. El anticuerpo murino 2B7 conocido es inactivo en este ensayo hasta una concentración de 83nM. El ensayo de supervivencia de los granulocitos usado en la presente descripción fue con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de IC50 en el ensayo de supervivencia representa la capacidad de un miembro de unión de inhibir la supervivencia de granulocitos humanos inducida por GM-CSF humano 7 pM. Para más detalle ver la sección de Materiales y Métodos de Ensayo.

En el ensayo de formación de colonias, los miembros de unión de la invención pueden tener una IC50 menor que 5, menor que 2.5, menor que 1 o menor que 0.3 µg/ml. Preferentemente la IC50 es 0.25 µg/ml o menor, por ejemplo menor que 0.1 µg/ml. La IC50 puede ser al menos 0.05 µg/ml. El anticuerpo murino 2B7 conocido tiene poca o ninguna actividad en este ensayo hasta una concentración de 10µg/ml (67nM). El ensayo de formación de colonias usado en la presente descripción fue con una concentración final de 10 ng/ml de GM-CSF humano. Así, la potencia de neutralización de IC50 en el ensayo de formación de colonia representa la capacidad de un miembro de unión de inhibir la formación de colonia inducida por 10 ng/ml de GM-CSF humano. Para más detalle ver la sección de Materiales y Métodos de Ensayo.

Un miembro de unión de la invención puede mostrar una capacidad dependiente de la dosis para inhibir el aumento de peso del bazo y/o para inhibir una disminución en los monocitos circulantes inducida por el GM-CSF en ratones quiméricos con médula ósea transgénica que expresan el GM-CSFR humano, que se tratan con el GM-CSF humano. La IC50 para la inhibición del peso aumentado del bazo puede ser menor que 5, menor que 2.5, menor que 2, menor que 1 o menor que 0.75 mg/kg. La IC50 puede ser al menos 0.5 mg/kg en algunas modalidades.

Además, la cinética de unión y afinidad de los miembros de unión para el GM-CSFR humano se puede determinar, por ejemplo, mediante la resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, mediante el uso del BIAcore. Los miembros de unión de la invención normalmente tienen una KD de menos que 4 nM y con mayor preferencia menor que 3, 2 ó 1 nM. Preferentemente, la KD es menor que 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 ó 0.15 nM.

Los miembros de unión de la invención normalmente enlazan el GM-CSFR de primate no-humano, por ejemplo, GM-CSFR de cinomolgo además de GM-CSFR humano. Como hay una baja homología entre el receptor de GM-CSF humano y murino (aproximadamente 36%), los miembros de unión de la invención generalmente no se unirán o reaccionarán de forma cruzada con el receptor murino.

Un miembro de unión de la invención comprende una molécula de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo entero o un fragmento de anticuerpo, como se discute en más detalle más abajo. Preferentemente, una molécula de anticuerpo de la invención es una molécula de anticuerpo humano.

Un miembro de unión de la invención normalmente comprende un dominio de anticuerpo VH y/o VL. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL están las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), y las regiones de marco, ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo típicamente comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende un VH CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco. Puede alternativamente o además comprender un dominio VL de anticuerpo que comprende un VL CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco. Un marco del dominio VH o VL comprende cuatro regiones de marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, intercaladas con las CDR en la siguiente estructura:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

Ejemplos de los dominios VH y VL de anticuerpo, PR y CDR de acuerdo con la presente invención son los enumerados en la lista de secuencias adjunta que forma parte de la presente descripción. Todas las secuencias de VH y VL, las secuencias de las CDR, los conjuntos de las CDR y los conjuntos de las HCDR y los conjuntos de las LCDR descritos en la presente descripción representan aspectos y modalidades de la invención. Así, un aspecto de la invención es un dominio VH de un miembro de unión de acuerdo con la invención. Un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Así, un conjunto de HCDR significa HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR significa LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se indique de cualquier otra forma, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR. Típicamente los miembros de unión de la invención son anticuerpos monoclonales (mAc).

Como se describe con más detalle en la parte experimental, se identificó un grupo de moléculas de anticuerpos que se unen al GM-CSFR. Además se identificaron ciertos residuos dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

de los dominios VH y VL que son especialmente importantes para la unión al receptor y la potencia de neutralización. Puesto que las CDR son principalmente responsables de determinar la unión y la especificidad de un miembro de unión, una o más CDR que tienen los residuos apropiados como se define en la presente descripción se pueden usar e incorporar en cualquier marco adecuado, por ejemplo un marco de dominio VH y/o VL de anticuerpo, o una proteína de andamiaje que no sea un anticuerpo, como se describe en más detalle en otra parte en la presente descripción. Por ejemplo, una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo puede ser injertado en un marco (por ejemplo, marco humano) para proporcionar una molécula de anticuerpo o moléculas de anticuerpos diferentes. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede comprender secuencias de CDR como se describe en la presente descripción y regiones de marco del segmento de gen de la línea germinal humana. Un anticuerpo puede estar provisto de un conjunto de CDR dentro de un marco que se puede someter a transformación a la línea germinal, donde uno o más residuos dentro del marco se cambian para que correspondan con los residuos en la posición equivalente en el marco de la línea germinal humana más similar. Así, las regiones de marco del anticuerpo son preferentemente de línea germinal y/o humanas.

Se llevó a cabo una investigación sobre qué residuos de un anticuerpo candidato eran importantes para el reconocimiento del antígeno, se siguió el método descrito en la sección experimental, y después se realizó el análisis de secuencia de 160 clones que mostraban una potencia al menos 5-veces mayor que el clon del anticuerpo parental en un ensayo biológico. Los resultados indicaron las siguientes posiciones que contribuyen a la unión del antígeno: residuos de Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90, 92 y 96 en el dominio VL y residuos de Kabat 17, 34, 54, 57, 95, 97, 99 y 100B en el dominio VH.

En modalidades preferidas de la invención, uno o más de estos residuos de Kabat es el residuo de Kabat presente en esa posición para uno o más de los clones de anticuerpos numerados 1, 2 y 4-20 cuyas secuencias se describen en la lista de secuencias adjunta. En varias modalidades el residuo puede ser el mismo, o puede ser diferente del residuo presente en esa posición en el anticuerpo 3.

El análisis indicó 4 posiciones de residuos en los CDR que tienen una influencia particularmente fuerte en la unión al receptor: H97, H100B, L90 y L92 (numeración de Kabat). Preferentemente, H97 de VH CDR3 es S. El residuo de serina en esta posición se observó en los 160 clones y por lo tanto representa un residuo importante para el reconocimiento del antígeno.

Preferentemente, una VH CDR3 comprende uno o más de los siguientes residuos:

V, N, A o L en el residuo de Kabat H95, con la máxima preferencia V;
S, F, H, P, T o W en el residuo de Kabat H99, con la máxima preferencia S;
A, T, P, S, V o H en el residuo de Kabat H100B, con la máxima preferencia A o T.

Preferentemente, el residuo de Kabat H34 en VH CDR1 es I. Preferentemente, VH CDR2 comprende E en el residuo de Kabat H54 y/o I en el residuo de Kabat H57.

Cuando el miembro de unión comprende un dominio VH de anticuerpo, el residuo de Kabat H17 en el marco del dominio VH es preferentemente S. El residuo de Kabat H94 es preferentemente I o una sustitución conservadora del mismo (por ejemplo. L, V, A o M). Normalmente H94 es I.

Preferentemente, una VL CDR3 comprende uno o más de los siguientes residuos:

S, T o M en el residuo de Kabat L90, con la máxima preferencia S o T;
D, E, Q, S, M o T en el residuo de Kabat L92, con la máxima preferencia D o E;
A, P, S, T, I, L, M o V en el residuo de Kabat L96, con la máxima preferencia S, P, I o V, especialmente S.

El residuo de Kabat L95A en VL CDR3 es preferentemente S.

Preferentemente, una VL CDR1 comprende uno o más de los siguientes residuos:

S en el residuo de Kabat 27A;
N en el residuo de Kabat 27B;
I en el residuo de Kabat 27C;
D en el residuo de Kabat 32.

Preferentemente, una VL CDR2 comprende uno o más de los siguientes residuos:

N en el residuo de Kabat 51;
N en el residuo de Kabat 52;

K en el residuo de Kabat 53.

5 En una modalidad preferida, un miembro de unión de la invención comprende una o más CDR seleccionadas a partir de las CDR de VH y VL, es decir, una VH CDR1, 2 y/o 3 y/o una VL CDR 1, 2 y/o 3 de cualquiera de los anticuerpos 1, 2 o 4 a 20 como se muestra en la lista de secuencias. En una modalidad preferida un miembro de unión de la invención comprende una VH CDR3 de cualquiera de las siguientes moléculas de anticuerpo: Anticuerpo 1 (sec. con núm. de ident. 5); Anticuerpo 2 (sec. con núm. de ident. 15) ; Anticuerpo 4 (sec. con núm. de ident. 35); Anticuerpo 5 (sec. con núm. de ident. 45); Anticuerpo 6 (sec. con núm. de ident. 55); Anticuerpo 7 (sec. con núm. de ident. 65); Anticuerpo 8 (sec. con núm. de ident. 75); Anticuerpo 9 (sec. con núm. de ident. 85); Anticuerpo 10 (sec. con núm. de ident. 95) ; Anticuerpo 11 (sec. con núm. de ident. 105); Anticuerpo 12 (sec. con núm. de ident. 115); Anticuerpo 13 (sec. con núm. de ident. 125); Anticuerpo 14 (sec. con núm. de ident. 135); Anticuerpo 15 (sec. con núm. de ident. 145); Anticuerpo 16 (sec. con núm. de ident. 155); Anticuerpo 17 (sec. con núm. de ident. 165); Anticuerpo 18 (sec. con núm. de ident. 175); Anticuerpo 19 (sec. con núm. de ident. 185); Anticuerpo 20 (sec. con núm. de ident. 195). Preferentemente, el miembro de unión comprende además una VH CDR1 de sec. con núm. de ident.: 3 o sec. con núm. de ident.: 173 y/o una VH CDR2 de sec. con núm. de ident.: 4. Preferentemente, un miembro de unión que comprende VH CDR3 de sec. con núm. de ident.: 175 comprende una VH CDR1 de sec. con núm. de ident.: 173, pero puede comprender alternativamente una VH CDR1 de sec. con núm. de ident.: 3.

20 Preferentemente el miembro de unión comprende un conjunto de VH CDR de uno de los siguientes anticuerpos: Anticuerpo 1 (sec. con núm. de ident. 3-5); Anticuerpo 2 (sec. con núm. de ident. 13-15); Anticuerpo 4 (sec. con núm. de ident. 33-35); Anticuerpo 5 (sec. con núm. de ident. 43-45); Anticuerpo 6 (sec. con núm. de ident. 53-55); Anticuerpo 7 (sec. con núm. de ident. 63-65); Anticuerpo 8 (sec. con núm. de ident. 73-75); Anticuerpo 9 (sec. con núm. de ident. 83-85); Anticuerpo 10 (sec. con núm. de ident. 93-95); Anticuerpo 11 (sec. con núm. de ident. 103-105); Anticuerpo 12 (sec. con núm. de ident. 113-115); Anticuerpo 13 (sec. con núm. de ident. 123-125); Anticuerpo 14 (sec. con núm. de ident. 133-135); Anticuerpo 15 (sec. con núm. de ident. 143-145); Anticuerpo 16 (sec. con núm. de ident. 153-155); Anticuerpo 17 (sec. con núm. de ident. 163-165); Anticuerpo 18 (sec. con núm. de ident. 173-175); Anticuerpo 19 (sec. con núm. de ident. 183-185); Anticuerpo 20 (sec. con núm. de ident. 193-195). Opcionalmente puede comprender además un conjunto de VL CDR de uno de estos anticuerpos, y las VL CDR pueden ser del mismo anticuerpo o uno diferente como las VH CDRs. Generalmente, un dominio VH se aparea con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión antígeno anticuerpo, aunque en algunas modalidades un dominio VH o VL solo se puede usar para unirse al antígeno. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la materia, y así el dominio VH y VL no necesitan ser del mismo clon como se describe en la presente descripción.

35 Un miembro de unión puede comprender un conjunto de CDR H y/o L de cualquiera de los anticuerpos 1 a 20 con una o más sustituciones, por ejemplo diez o menos, por ejemplo una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones dentro del conjunto descrito de CDR H y/o L. Las sustituciones preferidas son en los residuos de Kabat distintos de los residuos de Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90, 92 y 96 en el dominio VL y los residuos de Kabat 34, 54, 57, 95, 97, 99 y 100B en el dominio VH. Cuando se realizan sustituciones en estas posiciones, la sustitución es preferentemente para un residuo indicado en la presente descripción como un residuo preferido en esta posición.

40 En una modalidad preferida, un miembro de unión de la invención es una molécula de anticuerpo humano aislado que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en un marco de la línea germinal humana, por ejemplo, el marco de la línea germinal humana a partir de la familia VH1 o VH3 de cadena pesada. En una modalidad preferida, la molécula de anticuerpo humano aislado tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en un marco de la línea germinal humana VH1 DP5 o VH3 DP47. Así, las regiones de marco del dominio VH pueden comprender regiones de marco del segmento de gen de la línea germinal humana VH1 DP5 o VH3 DP47. La secuencia de aminoácidos de VH FR1 puede ser la sec. con núm. de ident.: 251. La secuencia de aminoácidos de VH FR2 puede ser la sec. con núm. de ident.: 252. La secuencia de aminoácidos de VH FR3 puede ser la sec. con núm. de ident.: 253. La secuencia de aminoácidos de VH FR4 puede ser la sec. con núm. de ident.: 254.

50 Normalmente los miembros de unión además tienen un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, preferentemente en un marco de línea germinal humana por ejemplo, un marco de línea germinal humana a partir de la familia de cadena ligera VLambda 1 o VLambda 6. En una modalidad preferida, la molécula de anticuerpo humano aislado tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR en un marco de la línea germinal humana VLambda 1 DPL8 o VLambda 1 DPL3 o VLambda 6_6a. Así, el marco del dominio VL puede comprender regiones de marco del segmento de gen de la línea germinal humana VLambda 1 DPL8, VLambda 1 DPL3 o VLambda 6_6a. El FR4 del dominio VL puede comprender una región de marco del segmento de la línea germinal humana JL2. La secuencia de aminoácidos de VL FR1 puede ser la sec. con núm. de ident.: 255. La secuencia de aminoácidos de VL FR2 puede ser la sec. con núm. de ident.: 256. La secuencia

de aminoácidos de VL FR3 puede ser la sec. con núm. de ident.: 257. La secuencia de aminoácidos de VL FR4 puede ser la sec. con núm. de ident.: 258.

5 Un anticuerpo que no es de línea germinal tiene las mismas CDR, pero marcos diferentes, en comparación con un anticuerpo que se transformó a línea germinal.

10 Un miembro de unión de la invención puede competir por la unión al GM-CSFR α con cualquier miembro de unión descrito en la presente descripción por ejemplo, el anticuerpo 3 o cualquiera de los anticuerpos 1, 2 o 4-20. Así un miembro de unión puede competir por la unión al GM-CSFR α con una molécula de anticuerpo que comprende el dominio VH y el dominio VL de cualquiera de los anticuerpos 1, 2 o 4-20. La competencia entre los miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo, mediante el etiquetado de una molécula reportera a un miembro de unión que se puede detectar en presencia de uno o más de otros miembros de unión no etiquetados, para permitir la identificación de los miembros de unión que se unen al mismo epítipo o un epítipo superpuesto.

15 La competencia se puede determinar por ejemplo por medio del uso del ELISA en el que por ejemplo el dominio extracelular de GM-CSFR α , o un péptido del dominio extracelular, se inmoviliza en una placa y un primer miembro de unión etiquetado junto con uno o más de otros miembros de unión no etiquetados se añaden a la placa. La presencia de un miembro de unión no etiquetado que compite con el miembro de unión etiquetado se observa por una disminución en la señal emitida por el miembro de unión etiquetado. De manera similar, un ensayo de resonancia de plasmón superficial se puede usar para
20 determinar la competencia entre los miembros de unión.

25 En las pruebas para la competencia se puede emplear un fragmento de péptido del antígeno, especialmente un péptido que incluye o que consiste prácticamente de un epítipo o región de unión de interés. Un péptido que tiene el epítipo o la secuencia diana más uno o más aminoácidos en cualquier extremo se puede usar. Los miembros de unión de acuerdo con la presente invención pueden ser tal que su unión por el antígeno es inhibida por un péptido con o que incluye la secuencia dada.

30 Los miembros de unión que se unen a un péptido se pueden aislar, por ejemplo, a partir de una genoteca de presentación en fago por paneo con el(los) péptido(s) .

35 Un miembro de unión como los anteriores puede usarse para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competencia, es decir, un método para medir el nivel de antígeno en una muestra mediante el empleo de un miembro de unión como se proporciona por la presente invención en un ensayo de competencia. Esto puede darse cuando no es necesaria la separación física del antígeno unido del no unido. La unión de la molécula reportera al miembro de unión de modo que un cambio físico u óptico se produce en la unión es una posibilidad. La molécula reportera puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferentemente señales medibles. La unión de las moléculas reporteras puede ser directa o indirectamente, covalente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico o no covalente. La unión a través de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión de genes de codificación para el anticuerpo y la molécula reportera.
40

45 Los niveles de antígenos pueden medirse además directamente, empleando un miembro de unión de acuerdo con la invención por ejemplo en un sistema biosensor.

50 La unión de un miembro de unión como se proporciona en la presente descripción al GM-CSFR α puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo, después de la administración de un miembro de unión, o el ácido nucleico que codifica un miembro de unión, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ELISA, transferencia de tipo Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, o ensayos basados en células tal como un ensayo de TF-1.

55 La cantidad de unión del miembro de unión a GM-CSFR α se puede determinar. La cuantificación se puede relacionar a la cantidad del antígeno en una muestra de prueba, que puede ser de interés diagnóstico o pronóstico.

Además se describe un kit que comprende un miembro de unión o molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o modalidad de la presente invención. En el kit, el miembro de unión o molécula de anticuerpo puede etiquetarse para permitir su reactividad en una muestra que se determinará, por ejemplo, como se describe más abajo. Los componentes de un kit son generalmente estériles y están en frascos u otros recipientes cerrados. Los kits se pueden emplear en análisis de diagnóstico u otros métodos para los cuales las moléculas de anticuerpo son útiles. Un kit puede contener instrucciones de uso de los componentes en un método. Los materiales auxiliares para ayudar en o para permitir realizar este método se pueden incluir en un kit de la invención.

Las reactividades de los anticuerpos en una muestra se puede determinar por cualquier medio adecuado. Radioinmunoanálisis (RIA) es una posibilidad. El antígeno radiactivo etiquetado se mezcla con el antígeno no etiquetado (la muestra de prueba) y permite que se una al anticuerpo. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radiactivo que se une al anticuerpo determinado. Mientras más antígeno haya en la muestra de prueba, menos antígeno radiactivo se unirá al anticuerpo. Un ensayo de unión competitiva además se puede usar con el antígeno no radiactivo, mediante el uso del antígeno o un análogo unido a una molécula reportera. La molécula reportera puede ser un fluorocromo, fósforo o láser de colorante con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Rojo. Los tintes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina. Otros reporteros incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas, como perlas de látex que son coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes activos biológicamente o químicamente que pueden directa o indirectamente causar señales detectables que se observan visualmente se detectan por vía electrónica o se registran de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas, que catalizan las reacciones que desarrollan, o cambian los colores o producen cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de tal manera que las transiciones electrónicas entre los estados de energía resultan en espectros de absorciones o emisiones característicos. Se pueden incluir entidades químicas que se usan conjuntamente con biosensores. Se pueden emplear los sistemas de detección biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por los conjugados anticuerpo-reportero individuales pueden usarse para obtener datos cuantificables absolutos o relativos de la unión relevante del anticuerpo en las muestras (normal y de prueba).

En otros aspectos, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión de acuerdo con la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN, y puede ser completamente o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos que figuran en la presente abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, a menos que el contexto exija otra cosa. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para una CDR o un conjunto de CDR o el dominio VH o el dominio VL o el sitio de unión antígeno-anticuerpo o la molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG1 o IgG4, de la invención como se define en la presente. La presente invención proporciona además las construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente.

Un aspecto adicional es una célula huésped in vitro que contiene el ácido nucleico de la invención. Dicha célula huésped puede estar en cultivo.

Dicho ácido nucleico puede introducirse en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante el uso de retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, en células de insecto, baculovirus. Para la introducción del ácido nucleico en la célula hospedera, en particular, una célula eucariota, se puede usar o un sistema que se basa en un virus o en un plásmido. El sistema de plásmido se puede mantener en forma episomal o puede ser incorporado a la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser por integración, aleatoria o específica de una o más copias en un loci único o en múltiples. Para las células bacterianas, las técnicas apropiadas pueden incluir la transformación con cloruro de calcio, la electroporación y la transfección mediante el uso de bacteriófagos.

La introducción se puede seguir por originar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en las condiciones para la expresión del gen.

En una modalidad, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

La presente invención además proporciona un método que comprende el uso de una construcción como se ha dicho en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión o polipéptido como el anterior. Así, los métodos para preparar un miembro de unión de la invención son aspectos adicionales de la invención. Un método puede comprender expresar dicho ácido nucleico bajo condiciones para provocar la producción de dicho miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL, y recuperarlo. Este método puede comprender cultivar las células huésped en condiciones para la producción de dicho miembro de unión o dominio de anticuerpo.

Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un método de producción puede comprender la formulación del producto en una composición que incluya al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células hospederas diferentes se conocen bien. Las células hospederas adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas está bien establecido en la materia [3]. Un huésped bacteriano común, preferido es *E. coli*.

10

La expresión en células eucariotas en cultivo además está disponible para aquellos con experiencia en la materia como una opción para la producción de un miembro de unión [4,5,6]. Las líneas de células de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células del melanoma del ratón NSO, células de mieloma de rata YB2/0, células embrionarias de riñón humano, células embrionarias de retina humana y muchas otras.

15

Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según proceda. Los vectores pueden ser plásmidos por ejemplo fagómico, o viral por ejemplo 'fago' según sea adecuado [7]. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica y análisis de las proteínas, se describen en detalle en Ausubel y otros [8].

20

Uno o más miembros de unión capaces de unirse al antígeno pueden obtenerse por un método que incluye poner en contacto una genoteca de los miembros de unión de acuerdo con la invención y dicho antígeno, y seleccionar uno o más miembros de unión de la genoteca capaces de unirse a dicho antígeno.

25

La genoteca se puede exhibir en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, paquetes genéticos replicables, tales como levadura, bacterias o partículas bacteriófagos (por ejemplo, T7), o sistemas de exposición covalentes, ribosomales u otros in vitro, cada partícula o complejo molecular contiene el ácido nucleico que codifica el dominio variable VH del anticuerpo que se expone en ella, y opcionalmente además un dominio VL exhibido si está presente. Después de la selección de los miembros de unión capaces de unirse al antígeno y que se exhiben en el bacteriófago otra genoteca de partículas o complejos moleculares, el ácido nucleico se puede tomar de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que exhibe un dicho miembro de unión seleccionado. Estos ácidos nucleicos se pueden usar en la producción posterior de un miembro de unión o un dominio variable VH y VL de anticuerpo mediante la expresión del ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico que se tomó de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que muestra dicho miembro de unión seleccionado.

30

35

Un dominio variable VH de un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de un anticuerpo del miembro de unión seleccionado, se puede proporcionar en forma aislada, como un miembro de unión que comprende tal dominio VH.

40

Un dominio VL variable de un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio VL variable de un anticuerpo de un miembro de unión seleccionado, se puede proporcionar en forma aislada, como un miembro de unión que comprende dicho dominio VL.

45

La capacidad para unir al GM-CSFR α se puede probar adicionalmente, además la capacidad para competir con cualquiera de los anticuerpos 1 a 20 (por ejemplo, en el formato de scFv y/o formato de IgG, por ejemplo, IgG1 o IgG4) por la unión al GM-CSFR α . La capacidad para neutralizar el GM-CSFR α se puede probar.

50

Las variantes de los dominios VH y VL y CDR de la presente invención, incluyen aquellas para las que las secuencias de aminoácidos se exponen en la presente descripción se pueden obtener por medio de métodos de alteración de la secuencia o mutación y tamizaje, y se pueden emplear en miembros de unión para el GM-CSFR α . Si se sigue el ejemplo de la química computacional en la aplicación de técnicas de análisis multivariado de datos a las relaciones estructura/propiedad-actividad [9] las relaciones cuantitativas actividad-propiedad de los anticuerpos se pueden obtener por medio del uso de técnicas matemáticas bien conocidas tales como la regresión estadística, la prospección de datos y clasificación [10,11,12,13,14,15]. Las propiedades de los anticuerpos se pueden obtener a partir de modelos empíricos y modelos teóricos (por ejemplo, el

55

análisis de residuos de contacto probables o la propiedad fisicoquímica calculada) de la secuencia del anticuerpo, las estructuras funcional y tridimensional y estas propiedades se pueden considerar individualmente y en conjunto.

5 Un sitio de unión antígeno-anticuerpo compuesto de un dominio VH y un dominio VL se forma por seis lazos del polipéptido: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de los anticuerpos de estructura atómica conocida ha aclarado las relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de combinación del anticuerpo [16,17]. Estas relaciones implican que, excepto para la tercera región (lazo) en los dominios VH, los lazos del sitio de unión tienen una de un pequeño número de conformaciones de la cadena principal: estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura canónica formada en un lazo en particular está determinada por su tamaño y la presencia de determinados residuos en sitios claves tanto en el lazo como en las regiones marco [16,17].

15 Este estudio de la relación secuencia-estructura se puede usar para la predicción de aquellos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, los cuales son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus lazos de CDR y por lo tanto mantienen la unión. Estas predicciones se pueden respaldar a diferencia de las predicciones para el resultado de los experimentos de optimización conducidos. En un enfoque estructural, se puede crear un modelo de la molécula de anticuerpo [18] por medio del uso del cualquier paquete libremente disponible o comercial tal como el WAM [19]. Un paquete de software de visualización y análisis de proteína tal como el Insight II (Accelrys, Inc.) o el Deep View [20] se pueden usar después para evaluar posibles sustituciones en cada posición en la CDR. Esta información se podría usar después para generar sustituciones que probablemente tengan un efecto mínimo o beneficioso en la actividad.

20 Las técnicas que se requieren para generar las sustituciones en las secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL del anticuerpo y los miembros de unión generalmente están disponibles en la materia. Se pueden hacer variantes de secuencias, con sustituciones que se pueden o no predecir que tendrán un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y probar la capacidad para unirse y/o neutralizar GM-CSFR α y/o cualquier otra propiedad que se desee.

25 Las variantes de la secuencia de aminoácido del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en la presente se pueden emplear de acuerdo con la presente invención, según se discutió. Variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), puede ser menor que aproximadamente 20 alteraciones, menor que aproximadamente 15 alteraciones, menor que aproximadamente 10 alteraciones o menor que aproximadamente 5 alteraciones, tal vez 5, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones se pueden realizar en una o más regiones de marco y/o en una o más CDR.

30 Preferentemente las alteraciones no resultan en pérdida de la función, por lo que un miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de esa manera preferentemente conserva una capacidad para unirse y/o neutralizar el GM-CSFR α . Con mayor preferencia, mantiene la misma capacidad cuantitativa de unión y/o neutralización que el miembro de unión en el que la alteración no se hace, por ejemplo, medido en un ensayo descrito en la presente. Con la máxima preferencia, el miembro de unión que comprende una secuencia aminoácido alterada así, tiene una capacidad mejorada para unirse o neutralizar el GM-CSFR α en comparación con un miembro de unión en el que la alteración no se hace, por ejemplo, medido en un ensayo descrito en la presente descripción.

35 La alteración puede comprender la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos con un aminoácido que no es de origen natural o estándar, la modificación de uno o más residuos de aminoácidos en una forma que no es de origen natural o estándar, o la inserción en la secuencia de uno o más aminoácidos que no es de origen natural o estándar. Los números y ubicaciones de las alteraciones preferidas en las secuencias de la invención se describen en otro lugar en la presente. Los aminoácidos naturales incluyen los 20 L-aminoácidos "estándares" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos estándares de una sola letra. Los aminoácidos no estándar incluyen todos los residuos que se puedan incorporar en un esqueleto de polipéptido o resultar de la modificación de un residuo de aminoácido existente. Los aminoácidos no estándar pueden ser de origen natural o pueden no ser de origen natural. Muchos aminoácidos no estándar de origen natural se conocen en la materia, tales como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxisilina, 3-metihistidina, N-acetilserina, etc. [21]. Aquellos residuos de aminoácido que son derivatizados en su posición N-alfa se localizarán solamente en el terminal N de una secuencia de aminoácido. Normalmente en la presente invención un aminoácido es un L-aminoácido, pero en algunas modalidades puede ser un D-aminoácido. La alteración, por lo tanto, puede comprender la modificación de un L-aminoácido en, o la sustitución por, un D-aminoácido. Las formas metilada, acetilada y/o fosforilada de aminoácidos además se conocen, y los aminoácidos en la presente invención pueden ser objeto de tal modificación.

Las secuencias de aminoácidos en los dominios de anticuerpos y miembros de unión de la invención pueden comprender aminoácidos no naturales o no estándar descritos anteriormente. En algunas modalidades los aminoácidos no estándar (por ejemplo, D-aminoácidos) se pueden incorporar en una secuencia de aminoácidos durante la síntesis, mientras que en otras modalidades los aminoácidos no estándar se pueden introducir por modificación o sustitución del aminoácido "original" estándar después de la síntesis de la secuencia de aminoácido.

El uso de aminoácidos no estándar y/o no naturales aumenta la diversidad estructural y funcional, y en consecuencia, aumenta el potencial para lograr la unión de GM-CSFR α deseada y neutralizar las propiedades en un miembro de unión de la invención. Además, se demostró que los D-aminoácidos y análogos tienen mejores perfiles farmacocinéticos en comparación con los L-aminoácidos estándar, debido a la degradación *in vivo* de los polipéptidos que tienen L-aminoácidos después de la administración a un animal.

Como se señaló anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR prácticamente como se expone en la presente es preferentemente portada como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una parte sustancial del mismo. Las secuencias HCDR3 prácticamente como se expone en la presente descripción representan modalidades preferidas de la presente invención y se prefiere que cada uno de estos se porte como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humana una porción sustancial de la misma.

Los dominios variables empleados en la invención se pueden obtener o derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado, o puede ser un dominio variable sintético que se basa en secuencias consenso o reales de los dominios variables humanos que se conocen. Una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo CDR3) se puede introducir en un repertorio de dominios variables que carecen de un CDR (por ejemplo CDR3), mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante.

Por ejemplo, Marks y otros (1992) [22] describen métodos para producir los repertorios de dominios variables de anticuerpos en los cuales los cebadores de consenso que se dirigen a o están adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable se usan junto con los cebadores de consenso para la tercera región marco de genes humanos de VH para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de una CDR3. Marks y otros describen además cómo este repertorio puede ser combinado con una CDR3 de un anticuerpo particular. Mediante el uso de técnicas análogas, las secuencias que se derivan de la CDR3 de la presente invención se pueden mezclar con repertorios de dominios de VH y VL que carecen de una CDR3, y los dominios completos de VH o VL mezclados, se combinan con un dominio VH o VL cognado para proporcionar los miembros de unión de la invención. El repertorio puede exhibirse después en un sistema de huésped adecuado tal como el sistema de exhibición de fagos de WO92/01047 o cualquiera de una gran cantidad referencia de literatura posterior, que se incluye [23], de manera que se pueden seleccionar los miembros de unión adecuados. Un repertorio puede consistir de algo a partir de 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo a partir de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros. Otros sistemas hospederos adecuados incluyen la exposición en levadura, exposición en bacterias, exposición en T7, exposición viral, exposición celular, exposición en ribosoma y exposición covalente. El intercambio de análogos o las técnicas combinatorias están además descritas por Stemmer (1994) [24], quien describe la técnica en relación a un gen β -lactamasa pero observa que el enfoque se puede usar para la generación de anticuerpos.

Otra alternativa es generar nuevas regiones VH o VL que portan secuencias derivadas de las CDR de la invención usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones en el dominio variable entero. Esta técnica es descrita por Gram y otros (1992) [25], que usa la PCR propensa a errores. En modalidades preferidas una o dos sustituciones de aminoácido se realizan dentro de un conjunto de HCDR y/o LCDR. Otro método que se puede usar es la mutagénesis directa a las regiones CDR de los genes VH o VL [26,27].

Un sitio de unión antígeno-anticuerpo para el antígeno GM-CSFR α puede obtenerse con un método que comprende proporcionar a través de la adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH establecido en la presente, un dominio VH el cual es una secuencia de aminoácidos variante del dominio VH, opcionalmente combinando el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL, y probando el dominio VH o la combinación o combinaciones VH/VL para identificar un miembro de unión o un sitio de unión antígeno-anticuerpo para el antígeno GM-CSFR α y opcionalmente, con una o más propiedades deseadas, preferentemente capacidad de neutralizar la actividad de GM-CSFR α . Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácido que es sustancialmente como se expone en la presente descripción.

Se puede emplear un método similar, en el que una o más variantes de la secuencia de un dominio VL descrito en la presente, se combinan con uno o más dominios VH.

Un miembro de unión para el antígeno GM-CSFR α , el cual puede prepararse por un método comprende:

- (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos de codificación de un dominio VH el cual incluye una CDR3 que se sustituye o carece de una región de codificación CDR3;
- (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente según lo establecido en la presente para una VH CDR3 de tal manera que el ácido nucleico donante se inserta en la región CDR3 en el repertorio, con el fin de ofrecer un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;
- (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;
- (d) seleccionar un miembro de unión para GM-CSFR α ; y
- (e) recuperar dicho miembro de unión o ácido nucleico de codificación del mismo.

Una vez más, un método análogo se puede emplear en el que un VL CDR3 de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican para un dominio VL que incluye una CDR3 que se sustituye o carecen de una región de codificación de CDR3.

Del mismo modo, una o más, o las tres CDR se pueden injertar en un repertorio de dominios VH o VL que luego son detectados por un miembro de unión o miembros de unión para GM-CSFR α .

En una modalidad preferida, una o más HCDR1, HCDR2 y HCDR3, por ejemplo un conjunto de HCDRs del Anticuerpo 1 (sec. con núms. de ident.: 3-5); Anticuerpo 2 (sec. con núms. de ident.: 13-15); Anticuerpo 4 (sec. con núms. de ident.: 33-35); Anticuerpo 5 (sec. con núms. de ident.: 43-45); Anticuerpo 6 (sec. con núms. de ident.: 53-55); Anticuerpo 7 (sec. con núms. de ident.: 63-65); Anticuerpo 8 (sec. con núms. de ident.: 73-75); Anticuerpo 9 (sec. con núms. de ident.: 83-85); Anticuerpo 10 (sec. con núms. de ident.: 93-95); Anticuerpo 11 (sec. con núms. de ident.: 103-105); Anticuerpo 12 (sec. con núms. de ident.: 113-115); Anticuerpo 13 (sec. con núms. de ident.: 123-125); Anticuerpo 14 (sec. con núms. de ident.: 133-135); Anticuerpo 15 (sec. con núms. de ident.: 143-145); Anticuerpo 16 (sec. con núms. de ident.: 153-155); Anticuerpo 17 (sec. con núms. de ident.: 163-165); Anticuerpo 18 (sec. con núms. de ident.: 173-175); Anticuerpo 19 (sec. con núms. de ident.: 183-185) o Anticuerpo 20 (sec. con núms. de ident.: 193-195); u opcionalmente el Anticuerpo 3 (sec. con núms. de ident.: 23-25), pueden emplearse, y/o uno o más LCDR1, LCDR2 y LCDR3 por ejemplo un conjunto de LCDR del Anticuerpo 1 (sec. con núms. de ident.: 8-10); Anticuerpo 2 (sec. con núms. de ident.: 18-20); Anticuerpo 4 (sec. con núms. de ident.: 38-40); Anticuerpo 5 (sec. con núms. de ident.: 48-50); Anticuerpo 6 (sec. con núms. de ident.: 58-60); Anticuerpo 7 (sec. con núms. de ident.: 68-70); Anticuerpo 8 (sec. con núms. de ident.: 78-80); Anticuerpo 9 (sec. con núms. de ident.: 88-90); Anticuerpo 10 (sec. con núms. de ident.: 98-100); Anticuerpo 11 (sec. con núms. de ident.: 108-110); Anticuerpo 12 (sec. con núms. de ident.: 118-120); Anticuerpo 13 (sec. con núms. de ident.: 128-130); Anticuerpo 14 (sec. con núms. de ident.: 138-140); Anticuerpo 15 (sec. con núms. de ident.: 148-150); Anticuerpo 16 (sec. con núms. de ident.: 158-160); Anticuerpo 17 (sec. con núms. de ident.: 168-170); Anticuerpo 18 (sec. con núms. de ident.: 178-180); Anticuerpo 19 (sec. con núms. de ident.: 188-190) o Anticuerpo 20 (sec. con núms. de ident.: 198-200); u opcionalmente el Anticuerpo 3 (sec. con núms. de ident.: 28-30), pueden emplearse.

Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con las regiones marco que intervienen. Preferentemente, la parte además incluirá al menos aproximadamente 50% de una o ambas, de las regiones de marco primera y cuarta donde el 50 % es el C-terminal 50% de la primera región marco y el 50% de la región N-terminal de la cuarta región marco. Los residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden no estar normalmente asociados con regiones de dominios variables naturales. Por ejemplo, la construcción de los miembros de unión de la presente invención hechos por técnicas de ADN recombinante pueden dar lugar a la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por enlazadores que se introducen para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Las otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir los dominios variables de la invención a otras secuencias de proteínas, que incluyen las regiones constante de anticuerpos, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas funcionales/detectables como se discutió en más detalle en la presente.

Aunque en un aspecto preferido de la invención, se prefieren los miembros de unión que comprenden un par de dominios VH y VL, los dominios de unión sencillos basados en cualquiera de las secuencias de los dominios VH o VL forman aspectos adicionales de la invención. Se sabe que los dominios individuales de inmunoglobulina, sobre todo los dominios VH, son capaces de unir los antígenos diana. Por ejemplo, vea la discusión de dAbs en otra parte de la presente descripción.

- 5 En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios se pueden usar para detectar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaces de unirse a GM-CSFR α . Esto se puede lograr por métodos de detección de exhibición de fagos usando el llamado doble enfoque combinatorio jerárquico como se describe en WO92/01047, en el cual una colonia individual que contiene, ya sea un clon de cadena H o L se usa para infectar una genoteca completa de los clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión resultante de dos cadenas se selecciona de acuerdo con las técnicas de exhibición de fagos tales como aquellas que se describen en esa referencia y [22].
- 10 Aspectos adicionales de la presente invención proporcionan composiciones que contienen los miembros de unión de la invención y al menos un componente adicional, por ejemplo, una composición que comprende un miembro de unión y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones se pueden usar en métodos de inhibir o neutralizar el GM-CSFR α , que incluyen métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante la terapia.
- 15 La invención proporciona preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas del anticuerpo anti-GM-CSFR α . Por ejemplo, estas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos de cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina terminal C, con distintos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo ácido piroglutámico.
- 20 Se describen en la presente descripción métodos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión como se proporciona, las composiciones farmacéuticas que comprenden tales miembros de unión, y el uso de tal miembro de unión en la fabricación de un medicamento, por ejemplo en un método de fabricación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende la formulación del miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 El tratamiento anti-GM-CSFR α puede administrarse oralmente (por ejemplo nanocuerpos), por inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intra-arterial, intra-articular, intraperitoneal o intramuscular), por inhalación, por la ruta intravesicular (instilación en la vejiga urinaria), o en forma tópica (por ejemplo intraocular, intranasal, rectal, en heridas, en la piel). El tratamiento se puede administrar mediante la infusión de pulso, en particular con disminución de las dosis del miembro de unión. La vía de administración se puede determinar por las características físico-químicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad o por la necesidad de optimizar la eficacia o reducir al mínimo los efectos secundarios. Se prevé que el tratamiento anti-GM-CSFR α no se limitará a su uso en la clínica. Por lo tanto, se prefiere además la inyección subcutánea usando un dispositivo sin aguja.
- 30 Una composición se puede administrar sola o en conjunto con otros tratamientos, ya sea simultáneamente o secuencialmente en dependencia de la afección a tratar. Los tratamientos de combinación se pueden usar para proporcionar importantes efectos sinérgicos, en particular la combinación un miembro de unión anti-GM-CSFR α con uno o más de otros fármacos. Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en conjunto o adición de uno o más de los siguientes: NSAID (por ejemplo, los inhibidores de la cox tales como Celecoxib y otros similares de los inhibidores de la cox2), los corticosteroides (por ejemplo, prednisona) y los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) por ejemplo, Humira (adalimumab), metotrexato, Arava, Enbrel (Etanercept), Remicade (Infliximab), Kineret (Anakinra), Rituxan (Rituximab), Orencia (abatacept), sales de oro, antipalúdicos, sulfasalazina, D-penicilamina, ciclosporina A, diclofenaco, ciclofosfamida y azatioprina.
- 35 De conformidad con la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a los individuos. La administración es preferentemente en una "cantidad terapéuticamente efectiva", esto es suficiente para mostrar el beneficio para un paciente. Dichos beneficios pueden ser al menos la mejoría de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y el curso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trata. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o progresión de una enfermedad a tratar. Las dosis adecuadas de anticuerpos se conocen bien en la materia [28,29]. Se pueden usar las dosis específicas indicadas en la presente o en Physician's Desk Reference (2003) según sea adecuado para el tipo de medicamento que se administra. Una cantidad terapéuticamente efectiva o la dosis adecuada de un miembro de unión de la invención se puede determinar mediante la comparación de su actividad *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal. Los métodos para extrapolación de las dosis efectivas en ratones y otros animales de prueba a humanos se conocen. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, que incluyen si el anticuerpo es para el diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la ubicación de la zona a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento, o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier etiqueta perceptible u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis típica de anticuerpo estará en el intervalo de 100 μ g a 1 g para aplicaciones sistémicas, y 1 μ g a 1mg para aplicaciones tópicas. Típicamente, el anticuerpo será un

anticuerpo completo, preferentemente IgG1, IgG2 o con mayor preferencia IgG4. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que se puede ajustar proporcionalmente para niños y bebés, y además se ajusta para los formatos de otros anticuerpos en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanal o mensual, según el criterio del médico. En modalidades preferidas de la presente invención, el tratamiento es periódico, y el período entre las administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, preferentemente aproximadamente tres semanas o más, con mayor preferencia aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. En otras modalidades preferidas de la invención, el tratamiento puede administrarse antes, y/o después de la cirugía, y con mayor preferencia, puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

Los miembros de unión de la presente invención por lo general se administran en forma de una composición farmacéutica, la cual puede comprender por lo menos un componente, además del miembro de unión. Así, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para el uso de conformidad con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizadores u otros materiales bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Estos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, por ejemplo intravenosa. Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo, líquido o semisólido. Una tableta puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido, tal como agua, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles, tales como glicol de etileno, glicol de propileno o glicol de polietileno. Para la inyección intravenosa o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad, y estabilidad adecuados. Aquellos con experiencia relevante en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas mediante el uso de, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como cloruro de sodio para inyección, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Los conservantes, estabilizadores, amortiguadores, antioxidantes y/u otros aditivos pueden incluirse, según se requiera. Los miembros de unión de la presente invención se pueden formular en forma líquida, semisólida o sólida, en dependencia de las propiedades físico-químicas de la molécula y la ruta de entrega. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de los excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y surfactantes. Las formulaciones líquidas pueden incluir una amplia gama de concentraciones de anticuerpos y pH. Las formulaciones sólidas se pueden producir por liofilización, atomización, o secado mediante la tecnología de fluidos supercríticos, por ejemplo. Las formulaciones de anti-GM-CSFR α dependerán de la vía de administración prevista: por ejemplo, las formulaciones para la administración pulmonar pueden consistir en partículas con propiedades físicas que garanticen la penetración en lo profundo de los pulmones por inhalación; las formulaciones tópicas pueden incluir agentes modificadores de la viscosidad, que prolongan el tiempo que el fármaco es residente en el lugar de acción. En ciertas modalidades, miembro de unión se puede preparar con un portador que protegerá al miembro de unión contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de entrega microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, polioctoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Ver, por ejemplo, Robinson, 1978 [30].

Los miembros de unión de acuerdo con la invención se pueden usar en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir el tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano el cual comprende la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de un miembro de unión de la invención. Las afecciones tratables de acuerdo con la presente invención incluyen cualquiera en la que el GM-CSFR α desempeña un papel. La literatura técnica publicada indica un papel para el GM-CSF en varias enfermedades y afecciones, como se resume más abajo. Dado que el GM-CSF se une específicamente al GM-CSFR α , los efectos patológicos y/o sintomáticos de GM-CSF se pueden contrarrestar mediante la inhibición de la unión de GM-CSF al GM-CSFR α . Así, la evidencia publicada, adicionalmente a los datos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* presentados para las moléculas de anticuerpo descritas en la presente descripción en la parte experimental, indica que los miembros de unión de la invención se pueden usar en el tratamiento afecciones, enfermedades y trastornos autoinmune y/o inflamatorio, por ejemplo la artritis reumatoide, el asma, la reacción alérgica, la esclerosis múltiple, la leucemia mieloide y la aterosclerosis. La evidencia publicada sobre estas afecciones se resumen más abajo:

Asma y respuestas alérgicas

El asma bronquial es un trastorno inflamatorio común persistente del pulmón caracterizada por vías respiratorias hiper-sensibles, la sobreproducción de moco, la fibrosis y los niveles elevados de IgE. Vías respiratorias hiper-sensibles (AHR) es la constricción exagerada de las vías respiratorias a los estímulos no específicos. Tanto la AHR y la sobreproducción de moco se piensa que son los responsables de la variable obstrucción de las vías respiratorias que conduce a la falta de aliento características de los ataques de asma (exacerbaciones) y que es responsable de la mortalidad asociada a esta enfermedad (alrededor de 2000 muertes/año en el Reino Unido).

Estudios recientes han demostrado que el GM-CSF y su receptor se regulan de manera ascendente tanto a nivel de proteína y ARNm en el asma. Además, los niveles de expresión se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Aumento de la producción de GM-CSF se ha medido en el lavado broncoalveolar (BAL), las células de BAL, el esputo, las células epiteliales bronquiolares, y las células mononucleares de sangre periférica estimuladas por el antígeno a partir de pacientes de asma en comparación con los sujetos no asmáticos [31,32]. Además, el nivel de expresión de GM-CSF en las vías respiratorias después del desafío con alérgeno se mostró que correlaciona con el grado de eosinofilia del tejido y la gravedad de la respuesta asmática de la fase tardía [33]. Los estudios posteriores vinculan la expresión de GM-CSFR regulada de manera ascendente con el asma intrínseca o no atópica, se correlacionan los niveles de expresión a los datos de función pulmonar [34]. En un modelo de ratón de sensibilización y desafío de ovoalbúmina, la neutralización de la actividad de GM-CSF con un anticuerpo policlonal de cabra, mediante la administración intranasal antes del desafío de ovoalbúmina, previno la hiper-sensibilidad de las vías respiratorias y redujo tanto la infiltración de eosinófilos y la secreción de moco en las vías respiratorias [35]. De manera similar en un modelo de ratón de enfermedad respiratoria alérgica iniciada mediante la administración intranasal de partículas de escape de diesel, la neutralización de GM-CSF de nuevo mediante la administración intranasal de un anticuerpo policlonal de cabra previno la hiper-sensibilidad de las vías respiratorias a la metacolina, redujo las cuentas de eosinófilos en BAL y además disminuyó la expresión de células calciformes productoras de moco en el epitelio de las vías respiratorias [36].

El papel de GM-CSF en las respuestas alérgicas se ha investigado adicionalmente en modelos murinos de tolerancia inducida. Los ratones expuestos a dosis diarias repetidas de ovalbúmina nebulizada sin sensibilización previa desarrollan tolerancia a la ovoalbúmina y fallan en producir inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. La expresión de pulmón de GM-CSF a través de una construcción adenoviral altera las respuestas de estos animales y favorece la afluencia de eosinófilos en el BAL, la generación de la histología fenotípicamente alérgica y la hiperplasia de las células calciformes asociadas. Esta generación de una respuesta Th2 típica se evidencia adicionalmente mediante el aumento de las concentraciones séricas y en BAL de la IL-5 y la IL-4 en suero. Trabajo adicional en este modelo, la utilización de un ratón MHC II KO indica que el GM-CSF modula la interacción entre las células presentadoras de antígeno y las células T en las vías respiratorias de ese modo facilita la respuesta a la ovalbúmina mediada por las células T [37]. Significativamente, la actividad de GM-CSF como un potente activador de la respuesta Th2 se puede demostrar además en ratones carentes de IL-13 y/o IL-4, lo que indica que la neutralización de la actividad de GM-CSF presenta una vía terapéutica alternativa diferente de la actividad de estas citocinas.

Se han hecho observaciones similares en otro modelo murino en el que la exposición intranasal repetida a la ambrosía da como resultado la sensibilización de tipo Th2 y la inflamación leve de las vías respiratorias en la re-exposición al antígeno [38]. La administración de anticuerpos anti-GM-CSF junto con la ambrosía disminuyó la producción de citocina asociada a Th2, presumiblemente mediante la inhibición del GM-CSF endógeno. En contraste, la administración de la ambrosía a un microambiente de las vías respiratorias enriquecido con GM-CSF, ya sea por múltiples coadministraciones de GM-CSF recombinante o una única administración de un vector adenoviral que lleva el transgén de GM-CSF, dio como resultado la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias considerablemente mejorada y las respuestas de Th2 de memoria específica de ambrosía.

Artritis reumatoide (RA)

La RA es una enfermedad inflamatoria crónica y destructora de las articulaciones que afecta aproximadamente 1% de la población en el mundo industrializado. La RA se caracteriza por la hiperplasia y la inflamación de la membrana sinovial, la inflamación dentro del líquido sinovial, y la destrucción progresiva del hueso y el cartílago circundante que comúnmente conduce a incapacidad importante.

Mientras que la causa de la RA permanece desconocida, hay evidencias acumuladas para el papel de GM-CSF en la progresión de la RA. La RA se cree que se inicia y se conduce a través de un proceso antígeno-específico, mediado por las células T. En resumen, la presencia de un antígeno no identificado en un huésped susceptible se piensa que inicia una

respuesta de células T que conduce a la producción de citocinas de células T con el consiguiente reclutamiento de células inflamatorias, que incluyen neutrófilos, macrófagos y células B.

- 5 Muchas citocinas pro- y anti-inflamatorias se producen en la articulación reumatoide. Además, la progresión, reactivación y silenciamiento de la enfermedad están mediados a través de los cambios dinámicos en la producción de citocina dentro de la articulación. Particularmente, el TNF- α y la IL-1 se considera que ejercen un papel fundamental en la patogénesis de la RA y muchas de las terapias más nuevas desarrolladas o en desarrollo, para la enfermedad buscan inhibir la actividad de estas dos citocinas proinflamatorias.
- 10 Estudios recientes en modelos de roedores han sugerido un papel central y no redundante para el GM-CSF en el desarrollo y la progresión de la RA. La administración exógena de GM-CSF recombinante mejora la patología en dos modelos de RA en ratón diferentes, la artritis inducida por colágeno (CIA) [39] y un modelo de artritis monoarticular [40]. Adicionalmente a esto se ha demostrado que ratones knockout de GM-CSF (GM-CSF^{-/-}) son resistentes al desarrollo de la CIA y que los niveles de la IL-1 el factor de necrosis tumoral (TNF α) encontrado en el líquido articular sinovial se redujo en comparación con los ratones de tipo salvaje [41,42]. De manera similar, la inducción de la monoartritis por medio del uso de la inyección intra-articular de albúmina de suero bovino metilada y la IL-1 en ratones GM-CSF^{-/-} dio lugar a gravedad de la enfermedad reducida en comparación con ratones de tipo salvaje [43].
- 15 Además, la administración del mAc murino anti-GM-CSF alivia significativamente la gravedad de la enfermedad en modelos de artritis monoarticular y CIA. En el modelo de CIA, el tratamiento con el mAc fue eficaz en el tratamiento de la progresión de la enfermedad establecida, la histopatología y la disminución significativa de los niveles articulares de IL-1 y TNF- α . Adicionalmente, el tratamiento del mAc antes de la aparición de la artritis disminuye la gravedad de la enfermedad CIA [44,43].
- 20 Una serie de estudios han analizado los niveles de citocinas y receptores presentes en el líquido sinovial de artritis y en muestras de biopsias de membrana a partir de tejido humano. Las células mononucleares circulantes de 27 pacientes de RA, 13 voluntarios sanos y 14 pacientes con osteoporosis se evaluaron para los niveles de GM-CSFR mediante el uso de GM-CSF etiquetado con PE [45]. En este estudio se demostró que el doble de las células receptores positivas se detectaron en los pacientes de RA (53%), en comparación con los controles sanos (20%) y los pacientes sometidos a investigación por osteoporosis (25%), lo que sugiere que los monocitos se pueden inducir para responder al GM-CSF producido localmente. La expresión del gen de la citocina a partir de pacientes de RA [46] por medio del uso de la hibridación in situ de células SF demostró niveles elevados de GM-CSF, la IL-1, el TNF- α y la IL-6. Además, los sinoviocitos derivados de fibroblastos aislados y cultivados a partir de voluntarios normales demostraron elevados niveles de proteína de GM-CSF en respuesta la IL-1 α , la IL-1 β , el TNF- α y el TNF- β [47]. La cuantificación de los niveles séricos de GM-CSF en los pacientes de RA [48] mostró que los niveles de proteína se incrementaron en los pacientes de RA severa (366 pg/ml, n=26) y moderada (376 pg/ml, n=58) en comparación con el grupo control (174 pg/ml, n=43), se mostró además que el GM-CSF estaba significativamente elevado en el SF de pacientes con RA (1300 pg/ml).
- 30 Previamente se había observado que la administración de GM-CSF recombinante en pacientes tratados por neutropenia podría causar una exacerbación de la RA [49]. Se hicieron similares observaciones para un paciente con síndrome de Felty después del tratamiento con el GM-CSF recombinante [50].

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)

- 45 La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) se define como un estado de enfermedad caracterizado por limitación del flujo de aire que no es completamente reversible. La limitación crónica del flujo de aire es usualmente progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a las partículas o gases nocivos. La causa de esta limitación del flujo de aire es una mezcla de la enfermedad de las vías respiratorias pequeñas (bronquiolitis obstructiva) y la destrucción del parénquima (enfisema), las contribuciones relativas de los cuales varían de persona a persona. Los síntomas característicos resultantes de la COPD son tos, producción de esputo y disnea tras el esfuerzo. La COPD es un problema importante de salud pública y es la cuarta causa de morbilidad crónica y mortalidad en los Estados Unidos. La enfermedad está actualmente en tratamiento con fármacos originalmente desarrollados para el asma tales como los corticosteroides orales o inhalados con o sin broncodilatadores que incluyen los agonistas β . Sin embargo, ninguno de estos fármacos se ha demostrado que retrasa la progresión de la COPD [51]. Por ejemplo, los corticosteroides que suprimen marcadamente la inflamación eosinofílica en el asma no parecen tener ningún efecto sobre la inflamación vista en la COPD que es predominantemente mediada por neutrófilos [52]. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para la COPD que se dirigen específicamente a los procesos inflamatorios que subyacen a la fisiopatología de esta
- 55

enfermedad. El GM-CSF, a través de su papel en la función de los macrófagos y neutrófilos, pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la COPD.

5 En un estudio por medio del uso de la PCR cuantitativa se demostró que en la misma edad el esputo de la COPD contra el esputo de fumadores no-obstruidos el número de copias de GMCSF fue significativamente elevado [53]. Además, en un modelo de roedor de inflamación pulmonar inducida por el humo de cigarrillo, los animales tratados por vía intranasal con un anticuerpo contra GM-CSF 2 días, 4hrs y 1hr antes de la exposición al humo demostraron una reducción importante en los neutrófilos, los macrófagos y los niveles de MMP-9 a partir del BAL en comparación con el anticuerpo de control de isotipo 5 días después del desafío [54]. Estos estudios se soportan además en las propias observaciones de la investigación de los niveles de GM-CSF en el esputo inducido a partir de pacientes con una amplia gama de niveles de gravedad de la COPD. 10 En estos estudios se demostró que el GM-CSF estaba elevado en el esputo de aproximadamente 40% de los pacientes de COPD probados independientemente de la gravedad de la enfermedad, con los niveles de GMCSF que se aproximan a 500pg/ml en algunos casos. El GMCSF no parecía estar elevado en pacientes no fumadores y fumadores de control emparejados. Estos datos sugieren que el GM-CSF puede ser uno de los principales mediadores de la inflamación de las vías respiratorias inducida por el humo y la COPD. 15

Esclerosis múltiple (MS)

El GM-CSF se ha implicado en la enfermedad autoinmune esclerosis múltiple. Mediante la administración del antígeno glucoproteína mielina de oligodendrocitos (MOG) a roedores se puede inducir un modelo de esclerosis múltiple humana que demuestra muchos de los fenotipos de la MS tales como la inflamación del sistema nervioso central y la desmielinización que pueden resultar en una parálisis similar a la MS. En ratones GM-CSF nulos el MOG fue incapaz de inducir el fenotipo EAE [55]. Además, se demostró que estos ratones habían disminuido la proliferación de las células T al antígeno MOG y una disminución en la producción de las citocinas de Th1, la IL-6 y el IFN- γ . La administración de anticuerpos neutralizantes GM-CSF al mismo tiempo que el desafío al antígeno previno el inicio de la enfermedad durante 10 días después del tratamiento con evidencia de lesiones reducidas. Cuando se administró después del inicio de la enfermedad los ratones se recuperaron completamente dentro de los 20 días de tratamiento [55]. 20 25

Leucemia

El GM-CSF se ha implicado además en la leucemia mieloide, la leucemia mieloide juvenil crónica (JCML). Esta afección es un trastorno mieloproliferativo que afecta principalmente a pacientes menores de 4 años de edad. *In vitro* progenitores de granulocitos y macrófagos de sangre periférica (CFU-GM) de demuestran proliferación espontánea a bajas densidades celulares, una observación que no se ha descrito previamente para otros trastornos mieloproliferativos. Además, la depleción de monocitos a partir de estos cultivos abolió esta proliferación. Posteriormente se ha demostrado que esta proliferación espontánea es mediada a través de una hipersensibilidad de los progenitores de JCML a la citocina GM-CSF obtenida de monocitos [56,57,58,59,60,61]. En lugar de una sobreproducción o niveles elevados de GM-CSF en los pacientes JCML, la hipersensibilidad de los progenitores JCML parece ser a través de una ruta de transducción de la señal Ras inducida por el GM-CSF desregulada [62]. Los estudios recientes con un análogo de GM-CSF (E21R), que antagoniza la acción del GM-CSF en ambos estudios de unión y ensayos funcionales, se ha demostrado que mediante la inhibición de la acción de GM-CSF se puede reducir significativamente la carga de célula de JCML en un modelo de xenoinjerto en ratón inmunodeficiente combinado grave/diabético no obeso (SCID/NOD) de JCML [63]. La dosificación profiláctica sistémica de E21R en el momento del injerto previno a los progenitores de JCML el establecimiento en la médula ósea y la dosificación de E21R, 4 semanas después del injerto indujo remisión de JCML, con una reducción en la carga de célula. Además, la administración de E21R a ratones SCID/NOD co-injertados con médula ósea normal humana y médula ósea de JCML causó una reducción en la carga de JCML sin embargo las células de la médula ósea normal no se afectaron. 30 35 40

Aterosclerosis

La cardiopatía isquémica es la causa más frecuente de muerte en el mundo. Durante los últimos años el concepto de que la inflamación desempeña un papel importante en la patogénesis de la aterosclerosis ha aumentado, con la acumulación de células inflamatorias ocurre de la mano con la acumulación de lípidos en las paredes arteriales. 45

Una vez residente en las células inflamatorias de las paredes arteriales, como los monocitos y macrófagos, participan y perpetúan la respuesta inflamatoria local. Estos macrófagos además expresan receptores basureros para una gama de lipoproteínas y así contribuir a la diferenciación de las células en 'células espumosas'. Es la muerte de estas "células 50

espumosas" que contribuyen al desarrollo del núcleo de lípidos, una característica clásica de estas lesiones. Como la inflamación continúa dentro de estas placas ateroscleróticas estas células inflamatorias activadas liberan mediadores fibrogénicos y factores de crecimiento que promueven la proliferación de la célula de músculo liso (SMC) y la fibrosis de la placa. Además de promover la fibrosis estas células además liberan enzimas proteolíticas, tales como la metaloproteinasa de matriz (MMP), que contribuyen a una debilitación de la placa fibrosa, lo que las hace propensas a la ruptura. Estas placas una vez rotas liberan residuos celulares y factores de coagulación, tal como el factor tisular, en el vaso que estimula la cascada de la coagulación y desarrolla el trombo. La trombosis arterial resultante puede después conducir a la isquemia miocárdica o infarto.

Recientemente el GM-CSF se ha implicado en muchos aspectos de la progresión de la enfermedad en aterosclerosis. En las lesiones ateroscleróticas de conejos alimentados con colesterol se encontró que el GM-CSF se co-localiza con los macrófagos y en un menor grado a las células endoteliales y SMC [64]. Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión de GM-CSF además se aumenta en los vasos ateroscleróticos humanos en los sitios de acumulación de macrófagos y dentro de las SMC mediales y las células endoteliales [65]. Este aumento en los niveles de GM-CSF es, en parte, atribuido al contacto directo célula-célula de monocitos/macrófagos y células endoteliales durante la formación y la patogénesis de la lesión aterosclerótica [66]. Otro elemento clave en la lesión aterótica es la 'célula espumosa', eso es los macrófagos que han tomado las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL) a través de los receptores basureros en la superficie. In vitro esta captación de Ox-LDL puede además estimular a los macrófagos a proliferar a través de un mecanismo dependiente de GM-CSF [67].

Como la aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico los agentes antiinflamatorios tales como los glucocorticoides se han investigado. La dexametasona, un glucocorticoide antiinflamatorio, suprime el desarrollo de la aterosclerosis en diversos modelos experimentales en animales [68,69,70,71]. La eficacia de la cual se ha atribuido a la inhibición de la migración de SMC [72] y la proliferación [73], y la reducción en la quimiotaxis de monocitos y leucocitos circulantes [74]. Estudios recientes demuestran que la ox-LDL puede inducir la liberación de GM-CSF a partir de macrófagos peritoneales de ratón [75]. Además, después del tratamiento con dexametasona esta liberación de GM-CSF se inhibió en dependencia de la dosis, lo que sugirió que los efectos antiinflamatorios de la dexametasona están mediados por la inhibición de la ox-LDL inducida por la producción de GM-CSF. Como parece que el GM-CSF tiene un papel central en la aterosclerosis, una alternativa a los glucocorticoides podría ser inhibir la actividad de GM-CSF en esta indicación.

Terminología

"Y/o" donde se usa en la presente se debe tomar como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes específicos con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, tal como si cada uno se expusiese de forma individual en este documento.

GN-CSFR α y GM-CSF

CSFR α es la cadena alfa del receptor para el factor de estimulación de la colonia de granulocito macrófago. La secuencia de longitud completa de GM-CSFR α humano está depositada bajo el número de Acceso S06945 (gi:106355) [76] y se expone en la presente descripción como la sec. con núm. de ident.: 202. La forma madura de GM-CSFR α humano, es decir, con el péptido señal escindido, se expone en la presente descripción como la sec. con núm. de ident.: 206. A menos que el contexto lo indique de cualquier otra forma, las referencias en la presente descripción a GM-CSFR α se refieren a GM-CSFR α de primate humano o no-humano (por ejemplo, cinomolgo), normalmente humano. El GM-CSFR α puede ser GM-CSFR α de origen natural o GM-CSFR α recombinante.

El dominio extracelular de 298 aminoácidos del receptor α de GM-CSF humano tiene la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 205.

A menos que el contexto lo indique de cualquier otra forma, las referencias en la presente descripción a GM-CSF se refieren a GM-CSF de primate humano o no-humano (por ejemplo, cinomolgo), normalmente humano.

El GM-CSF normalmente se une a la cadena alfa del dominio extracelular (sec. con núm. de ident.: 205) del receptor GM-CSF maduro (sec. con núm. de ident.: 206). Como se describe en otra parte en la presente descripción, los miembros de unión de la invención inhiben esta unión.

Se han identificado variantes de empalme de GM-CSFR α de origen natural - ver, por ejemplo, las refs. [77 y 78]. El dominio

extracelular está muy conservado en estas variantes de empalme. Los miembros de unión de la invención pueden o no unirse a una o más variantes de empalme de GM-CSFR α , y pueden o no inhibir la unión de GM-CSF a una o más variantes de empalme de GM-CSFR α .

Miembro de unión

5 Este describe un miembro de unión de un par de moléculas que se unen entre sí. Los miembros de un par de unión pueden ser de origen natural o producidos sintéticamente total o parcialmente. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une a y por lo tanto es complementaria a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Ejemplos de tipos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de la hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se refiere a las reacciones del tipo antígeno-anticuerpo.

10 Un miembro de unión de acuerdo con la invención comprende una molécula de anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno.

15 Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión al antígeno, un miembro de unión de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, para formar un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o conferir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno. Los miembros de unión de la invención pueden portar una etiqueta detectable, o se pueden conjugar con una toxina o una enzima o porción identificada (por ejemplo, a través de un enlazador o enlace peptídil). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión al antígeno, en donde el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y de esta forma dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico podría inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

20 Aunque, como se indicó, las CDR pueden ser portadas por andamios tales como fibronectina o citocromo B [80, 81, 82], la estructura para portar una CDR o un conjunto de CDR de la invención, por lo general, será una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una parte sustancial de la misma en la que la CDR o conjunto de las CDR se encuentran en una ubicación que corresponde a la CDR o conjunto de CDR de dominios variables VH y VL de anticuerpos de de origen natural codificados por los genes de las inmunoglobulinas reordenadas. Las estructuras y las ubicaciones de los dominios variables de las inmunoglobulinas se pueden determinar por referencia a (Kabat, y otros, 1987 [98], y las actualizaciones del mismo, ahora disponible en la Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu> o encontrar "Kabat" por medio del uso de cualquier buscador).

25 Los miembros de unión de la presente invención pueden comprender, además, las regiones constantes o partes de las mismas, preferentemente regiones constantes de anticuerpos humanos o partes del mismo. Por ejemplo, un dominio VL se puede unir en su extremo C-terminal a los dominios constantes de la cadena ligera del anticuerpo que incluyen cadenas C κ o C λ humanas, preferentemente cadenas C λ . Del mismo modo, un miembro de unión que se basa en un dominio VH se puede unir en su extremo C-terminal a toda o parte (por ejemplo un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las clases de isotipo, particularmente IgG1, IgG2 e IgG4. Se prefiere IgG1, IgG2 o IgG4. La IgG4 se prefiere porque no se une al complemento y no crea las funciones efectoras. Cualquier variante de la región constante sintética o de otro tipo que tiene estas propiedades y estabiliza las regiones variables además se prefiere para su uso en las modalidades de la presente invención.

30 Los miembros de unión de la invención se pueden etiquetar con una etiqueta detectable o funcional. Las etiquetas detectables incluyen radiomarcadores tales como ^{131}I o ^{99}Tc , que se pueden unir a los anticuerpos de la invención por medio del uso de la química convencional conocida en la materia de la representación óptica por anticuerpos. Las etiquetas además incluyen etiquetas enzimáticas tales como la peroxidasa de rábano picante. Las etiquetas incluyen, además, fracciones químicas, tales como la biotina que se pueden detectar a través de la unión a una fracción específica detectable afín, por ejemplo, etiqueta de avidina. Así, un miembro de unión o molécula de anticuerpo de la presente invención pueden estar en forma de un conjugado que comprende el miembro de unión y una etiqueta, opcionalmente unido a través de un enlazador tal como un péptido. El miembro de unión puede estar conjugado por ejemplo a enzimas (por ejemplo, la peroxidasa, la fosfatasa alcalina) o una etiqueta fluorescente que incluyen, pero sin limitarse a, la biotina, el fluorocromo, la proteína fluorescente verde. Más aun, la etiqueta puede comprender una fracción de toxina tal como una fracción de toxina seleccionada de un grupo de exotoxina de pseudomonas (PE o un fragmento citotóxico o mutante de la misma), toxina de la difteria (un fragmento citotóxico o mutante de la misma), una toxina botulínica A a F, ricina o un fragmento citotóxico de la

misma, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma, toxina antiviral de hierba carmín o un fragmento citotóxico de la misma y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma. Cuando el miembro de unión comprende una molécula de anticuerpo, el miembro de unión etiquetado se puede denominar como un inmunoconjugado.

5 Molécula de anticuerpo.

Este describe una inmunoglobulina tanto natural o producida total o parcialmente de forma sintética. El término además cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión antígeno-anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo son moléculas tales como Fab, F(ab')₂, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de la tecnología del ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Estas técnicas pueden implicar la introducción de ADN de codificación para la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de marco, de una inmunoglobulina diferente. Ver, por ejemplo, EP-A-239400, GB 2188638A o EP-A-184187, y un gran cuerpo de literatura posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede estar sujeta a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la unión diana de los anticuerpos producidos.

Como los anticuerpos se pueden modificar en un número de maneras, el término "molécula de anticuerpo" se debe interpretar como que cubre cualquier miembro de unión o sustancia que tenga un sitio de unión antígeno-anticuerpo. Así, este término cubre fragmentos de anticuerpos y derivados, que incluyen cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión antígeno-anticuerpo, tanto natural o total o parcialmente sintético. Las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo, o equivalente, fusionado a otro polipéptido están por lo tanto incluidas. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y un gran cuerpo de literatura posterior.

Otras técnicas disponibles en la materia de ingeniería de anticuerpos permitieron aislar anticuerpos humanos y humanizados. Los anticuerpos humanos y humanizados son modalidades preferidas de la invención, y se pueden producir por medio del uso de cualquier método adecuado. Por ejemplo, se pueden hacer hibridomas humanos [83]. La presentación en fagos, otra técnica establecida para la generación de los miembros de unión, se describe en detalle en varias publicaciones tal como ref. [83] y WO92/01047 (discutida más abajo). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos de ratón se inactivan y se sustituyen funcionalmente con genes de anticuerpos humanos mientras deja intactos otros componentes del sistema inmune del ratón, se pueden usar para aislar anticuerpos humanos [84]. Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando técnicas conocidas en la materia tales como las descritas en por ejemplo WO91/09967, US 5,585,089, EP592106, US 565,332 y WO93/17105. Adicionalmente, WO2004/006955 describe métodos para humanizar anticuerpos, basado en la selección de secuencias de marco de la región variable a partir de los genes de anticuerpos humanos mediante la comparación de los tipos de estructura canónica de CDR para las secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con los tipos de estructura canónica de CDR para las correspondientes CDR a partir de una genoteca de secuencias de anticuerpos humanos, por ejemplo, segmentos de genes de anticuerpos de línea germinal. Las regiones variables de anticuerpos humanos que tienen tipos de estructura canónica de CDR similar a las CDR no-humanas son un subconjunto de miembros de secuencias de anticuerpos humanos para seleccionar las secuencias de marcos humanos. Los miembros del subgrupo además se pueden clasificar por similitud de aminoácidos entre las secuencias de CDR humana y no humana. En el método de WO2004/006955, secuencias humanas de clasificación superior se seleccionan para proporcionar las secuencias de marco para la construcción de un anticuerpo quimérico que funcionalmente sustituye las secuencias de las CDR humanas con las contrapartes de CDR no humanas mediante el uso del miembro que se selecciona del subconjunto de marcos humanos, de tal modo se proporciona un anticuerpo humanizado de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar las secuencias de marco entre los anticuerpos no humanos y humanos. Los anticuerpos quiméricos que se hacen según el método además se describen.

Las moléculas sintéticas de anticuerpos se pueden crear por la expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, [85, 86].

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo puede realizar la función de unión a los antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab consistente de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd consistente de los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv consistente de los dominios VL y VH de un solo anticuerpo;

(iv) el fragmento dAb [87, 88, 89] que consta de un dominio VH o un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen por un enlazador péptido que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno [90, 91]; (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena simple (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (WO94/13804; [92]). Las moléculas Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes de disulfuro que enlazan los dominios VH y VL [93]. Los minicuerpo que comprende un scFv unido a un dominio CH3 se puede hacer además [94].

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un pequeño fragmento monomérico de unión al antígeno de un anticuerpo, a saber la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo [89]. Los VH dAbs se producen de forma natural en los camélidos (por ejemplo, el camello, la llama) y se pueden producir por inmunización de un camélido con un antígeno diana, el aislamiento de células B específicas para el antígeno y la clonación directa de los genes de los dAb a partir de células B individuales. Los dAbs además se producen en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad a la temperatura los hace particularmente útiles desde el punto de vista fisiológico, y adecuados para la selección y maduración de la afinidad. Un miembro de unión de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente según se establece en la presente, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente según se establece en la presente. Por "sustancialmente como se expone" significa que el dominio CDR o VH o VL relevante de la invención será idéntico o muy similar a las regiones especificadas de las cuales la secuencia se expone en la presente descripción. Por "muy similar" se contempla que a partir de 1 a 5, preferentemente a partir de 1 a 4 tal como 1 a 3 ó 1 ó 2, ó 3 ó 4, sustituciones de aminoácido se pueden hacer en la CDR y/o el dominio VH o VL.

Cuando los anticuerpos biespecíficos se van a usar, estos anticuerpos pueden ser biespecíficos convencionales que se pueden fabricar en una variedad de formas [95], por ejemplo, preparados químicamente o de hibridomas híbridos, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos que se mencionaron anteriormente. Ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE™ en que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad se pueden usar y enlazar directamente a través de péptidos cortos flexibles. Esta combina dos anticuerpos en una única cadena polipeptídica corta. Los diacuerpos y los scFv se pueden construir sin región Fc, usando sólo dominios variables, lo que podría reducir los efectos de la reacción anti-idiotipo.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, además pueden ser particularmente útiles, ya que se pueden construir fácilmente y expresar en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión adecuadas, se pueden seleccionar fácilmente mediante el uso de una exposición en fagos (WO94/13804) a partir de genotecas. Si uno de los brazos del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, dirigido contra GM-CSFR α , entonces se puede hacer una genoteca, donde el otro brazo es variado y se selecciona un anticuerpo de unión específica adecuada. Los anticuerpos completos biespecíficos se pueden hacer por ingeniería de botón en ojal [96].

Sitio de unión al antígeno

Este describe la parte de la molécula que se une a y es complementaria a todo o a parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo este se conoce como el sitio de unión antígeno-anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une y complementa a la totalidad o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo sólo se puede unir a una parte específica del antígeno, cuya parte se denomina epítipo. Uno o más dominios variables de anticuerpos pueden proporcionar un sitio de unión antígeno-anticuerpo. Preferentemente, un sitio de unión antígeno-anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

Numeración de Kabat

Los residuos de secuencias de anticuerpo en la presente descripción, se refieren generalmente usando la numeración de Kabat como se define en Kabat y otros, 1971 [97]. Ver además las referencias. [98, 99].

Aislado

Esto se refiere al estado en el cual los miembros de unión de la invención, o ácido nucleico de codificación de dichos miembros de unión, estarán por lo general de conformidad con la presente invención. Los miembros aislados y el ácido

nucleico aislado, estará libre o sustancialmente libre del material con que se asocia naturalmente tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su ambiente natural, o el medio ambiente en el que están preparados (por ejemplo, cultivos de células) cuando tal preparación se realice por la tecnología del ADN recombinante que se practica *in vitro* o *in vivo*.

5

Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y todavía, a efectos prácticos aislar - por ejemplo, los miembros normalmente se mezclan con la gelatina o de otros vehículos si se usan para cubrir las placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclan con vehículos farmacéuticamente aceptables o diluyentes cuando se usan en el diagnóstico o tratamiento. Los miembros de la unión pueden ser glucosilados, ya sea natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden ser (por ejemplo si se producen por la expresión en una célula procarionota) no glicosilado.

10

Breve descripción de las figuras

15

Figura 1: Análisis de pA_2 de dos anticuerpos anti-GM-CSFR α en el ensayo de proliferación de TF-1. La proliferación de las células TF-1 con concentraciones crecientes de GM-CSF en presencia de concentraciones crecientes de dos IgG4 optimizadas, Anticuerpo 6 (Figura 1A) y Anticuerpo 1 (Figura 1B), respectivamente. Para los datos mostrados en el gráfico 1A y el gráfico 1B se midió la incorporación de timidina titulada y se calculó la EC50 de GM-CSF en cada concentración de anticuerpo. Para los datos mostrados en el gráfico 1C y el gráfico 1D las proporciones de las dosis se calcularon después y se analizaron mediante regresión de Schild con el fin de obtener los valores de pA_2 .

20

Figura 2. Análisis de pA_2 de un anticuerpo anti-GM-CSFR α , Anticuerpo 6, en los ensayos de cambio de forma de granulocitos. Los granulocitos humanos (gráfico 2A y 2C) o de cinomolgo (2B y 2D) se trataron con concentraciones crecientes de GM-CSF en presencia de concentraciones crecientes de IgG4. El cambio de forma de los granulocitos se midió por medio del uso de la citometría de flujo y se calculó la EC50 de GM-CSF en cada concentración de anticuerpo (gráfico 2A y gráfico 2B). Después se calcularon las proporciones de dosis se y se analizaron por regresión de Schild con el fin de obtener los valores de pA_2 (gráfico 2C y gráfico 2D).

25

Figura 3. La potencia antagonista de dos anticuerpos, Anticuerpos 1 y 6, respectivamente, como IgG4 en un ensayo de medición de la proliferación de las células TF-1 inducida por 7pM de GM-CSF humano. Además se muestran los datos para el control positivo de IgG4 2B7 y para un control de isotipo de IgG4. Los datos representan la media con las barras de desviación estándar de las determinaciones por triplicado dentro del mismo experimento.

30

Figura 4. La potencia antagonista de dos anticuerpos, Anticuerpos 1 y 6, respectivamente, como IgG4 en un ensayo de medición del cambio de forma de granulocitos humanos inducida por 7pM de GM-CSF humano. Además se muestran los datos para el control de IgG4 2B7 y para un control de isotipo de IgG4. Los datos representan la media con las barras de desviación estándar de las determinaciones por triplicado dentro del mismo experimento.

35

Figura 5. La potencia antagonista de dos anticuerpos, Anticuerpos 1 y 6, respectivamente, como IgG4 en un ensayo de medición de la liberación de TNF α a partir de monocitos humanos estimulados con 1nM de GM-CSF humano. Además se muestran los datos para el anticuerpo de control 2B7 y para un control de isotipo de IgG4. Los datos representan la media con las barras de desviación estándar de las determinaciones por triplicado dentro del mismo experimento.

40

Figura 6. La potencia antagonista de dos anticuerpos, Anticuerpos 1 y 6, respectivamente, como IgG4 en un ensayo de medición de la supervivencia de granulocitos humanos inducida por 7pM de GM-CSF humano. Además se muestran los datos para el anticuerpo de control 2B7 y para un control de isotipo de IgG4. Los datos representan la media con las barras de desviación estándar de las determinaciones por triplicado dentro del mismo experimento.

45

Figura 7. Los mAc humanos de afinidad madurada, el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 6, pero no el mAc 28G5 humano parental (Anticuerpo 3) o el anticuerpo murino 2B7 conocido, inhiben la diferenciación de las células progenitoras hemopoyéticas impulsada por el GM-CSF. 5×10^4 células mononucleares descongeladas a partir de una muestra de

aféresis se cultivaron en agar semisólido en presencia de 10 ng/ml de GM-CSF y la concentración indicada de mAc. Las colonias se contaron el día 14. El gráfico muestra el número de colonias contra la concentración de mAc en µg/ml.

5 Figura 8. Análisis de dosis-respuesta de la eficacia del mAc de afinidad madurada en los ratones quiméricos huGM-CSFR Tg. Grupos de 5 ratones quiméricos Tg se trataron con 500 ng de huGM-CSF (o PBS) s.c dos veces al día durante 4 días (D.1-D.4) y ya sea el mAc de control (CAT001) o de prueba (Anticuerpo 6) a las concentraciones indicadas en D.0. Los pesos del bazo se evaluaron en D.5.

10 Figura 9. Análisis de dosis-respuesta de la eficacia del Anticuerpo 6 en un ensayo de liberación de citocina endógena de células mononucleares de sangre periférica humana. 1×10^6 células se cultivaron durante 72 horas en presencia y en ausencia de anticuerpo y una IL-6 y TNF α se realizó un ELISA en el sobrenadante. Los datos representan la inhibición media con barras de desviación estándar de las determinaciones por duplicado dentro del mismo experimento.

Parte experimental

Antecedentes

15 Los fragmentos de anticuerpos humanos se pueden seleccionar *in vitro* a partir de repertorios presentados en la superficie de un bacteriófago filamentoso. Este proceso se conoce como presentación en fagos y proporciona un medio de obtención de fragmentos de anticuerpos humanos. El proceso se puede usar para aislar especificidades humanas anti-humana y se puede adaptar para obtener anticuerpos de características de afinidad particular.

20 Los fragmentos de anticuerpos que consisten sólo de los dominios variable de cadena pesada (VH) y variable de cadena ligera (VL) unidos por un péptido enlazador corto contienen toda la información que es necesaria para determinar la unión al antígeno. Dichos fragmentos se conocen como Fv de cadena sencilla (scFv). Cuando se presentan en la superficie del fago, el scFv se ha demostrado tanto que se pliega correctamente como que se une al antígeno. Grandes repertorios de scFv humano se han construido de esta manera, y han proporcionado una fuente a partir de la que se pueden aislar clones individuales para el desarrollo como fármacos candidatos. Los scFv candidatos después se reformatean como moléculas de IgG enteras (típicamente IgG humana) para aplicaciones terapéuticas.

Sumario

30 Las selecciones se llevaron a cabo en una genoteca de presentación en fago de scFv derivados de linfocitos de bazo humano con el fin de enriquecer las poblaciones de fagos que se unan al GM-CSFR α humano. Se aislaron anticuerpos scFv que tienen las características seleccionadas y estos scFv se convirtieron en IgG $_4$. Por medio del uso de una variedad de ensayos, se aisló un panel de anticuerpos, se optimizaron y se transformaron a la línea germinal para producir IgG $_4$ con la especificación adecuada para un anticuerpo terapéutico.

35 Los 19 clones de anticuerpos, cuyas secuencias se muestran como anticuerpos 1, 2 y 4-20 en la lista de secuencias, se obtuvieron de un anticuerpo parental. El parental se muestra como anticuerpo 3 en la lista de secuencias, y además se refiere en la presente descripción como 28G5. Los 19 clones se seleccionaron como que mostraban propiedades particularmente buenas en una serie de ensayos biológicos, como se describe en la parte experimental, y se designaron los anticuerpos números 1, 2 y 4 a 20.

40 Los bioensayos se diseñaron para reflejar la naturaleza inflamatoria de enfermedades tales como la artritis reumatoide. Por ejemplo, el cambio de forma de los neutrófilos necesaria para su reclutamiento al sitio de acción, la liberación de factores proinflamatorios por los monocitos y el aumento de la supervivencia de los tipos de células inflamatorias en respuesta a señales particulares. Los anticuerpos presentan una potente actividad de neutralización en estos ensayos.

45 Protocolos detallados de los métodos de ensayo usados se proporciona más abajo en la sección titulada "Materiales y Métodos de Ensayo".

Aislamiento de anticuerpos guías

Una gran genoteca de anticuerpo humano de cadena sencilla FV (scFv) se usó para las selecciones. Esta se obtuvo a partir de linfocitos de bazo a partir de 20 donantes sanos y se clonó en un vector fagémido. Los scFv que reconocen el GM-CSFR α , se aislaron a partir de la genoteca de presentación en fago en una serie de repetidos ciclos de selección con el GMCSF-R α purificado obtenido a partir de la purificación etiquetada de la sobreexpresión de un dominio extracelular del receptor soluble en las células HEK293T. Esto se logró prácticamente como se describe en Vaughan y otros [102]. En resumen, después de la exposición del receptor biotinilado a la genoteca en fago, la proteína con el fago unido se capturó en perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Los fagos no unidos se lavaron. Después los fagos unidos se rescataron como ha descrito Vaughan y otros y el proceso de selección se repitió. Se llevaron a cabo tres rondas de selección al reducir las concentraciones de antígeno. Una proporción representativa de scFv a partir de la salida de las rondas de selección se sometieron a secuenciación de ADN.

Después de estas primeras selecciones a partir de la genoteca de presentación en fago, se identificó un panel de scFv individuales en un ensayo de unión del ligando, que se diseñó para identificar los fagos que expresaban anticuerpos scFv que eran capaces de inhibir la unión de GM-CSF al dominio extracelular de GM-CSFR α purificado. La potencia neutralizante de estos scFv en el ensayo de unión del ligando se encuentra en el intervalo a partir de 0.65 a 3.3 nM.

Los anticuerpos que estaban activos en el ensayo bioquímico de unión al ligando se evaluaron para la actividad biológica en un ensayo de proliferación de TF-1, que midió la potencia de neutralización mediante el ensayo de capacidad de los anticuerpos para inhibir la proliferación de las células TF-1 estimuladas con GM-CSF. TF-1 es una línea celular humana premeioide establecida a partir de paciente con eritroleucemia. Esta línea celular es dependiente de factor para la supervivencia y la proliferación y rutinariamente se mantiene en GM-CSF humano. La inhibición de la proliferación dependiente de GM-CSF se determinó mediante la medición de la reducción en la incorporación de timidina tritiada en el ADN recién sintetizado de las células en división. Todos los scFv tenían una potencia medible en este ensayo, con valores de IC₅₀ que estaban en el intervalo de aproximadamente 180 a 12.00 nM.

Los clones scFv más potentes se reformatearon como moléculas de anticuerpo de IgG4 humana con un dominio constante de cadena pesada gamma 4 humana y un dominio constante de cadena ligera lambda humana. Los vectores se construyeron para los clones de scFv más potentes con el fin de permitir la expresión de los anticuerpos como anticuerpos IgG4 enteros como describen Persic y otros. [100] con pequeñas modificaciones. Se incluyó en los vectores un fragmento oriP para facilitar el uso con las células HEK-EBNA 293 y permitir la replicación episomal. El dominio variable VH se clonó en el polienlazador entre la secuencia líder de secreción y el dominio constante gamma 4 humano del vector de expresión pEU8.1(+). El dominio variable VL se clonó en el polienlazador entre la secuencia líder de secreción y el dominio constante lambda humano del vector de expresión pEU4.1(-). Las células HEK-EBNA 293 se co-transfectaron con las construcciones que expresaban la cadena pesada y ligera y el anticuerpo entero se purificó a partir del medio condicionado por medio del uso de la cromatografía de afinidad en proteína A. Las preparaciones de anticuerpos se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4°C en solución salina regulada con fosfato (PBS) antes de la evaluación. La concentración de proteína se determinó mediante la medición de la absorbancia a 280nm por medio del uso del método BCA (Pierce).

Las IgG reformateadas se compararon con el anticuerpo murino 2B7 conocido, en el ensayo de proliferación de TF-1. Las IgG4 retuvieron o adquirieron actividad en este ensayo, con valores de IC₅₀ que estaban en el intervalo a partir de 6 a aproximadamente 1600 nM.

En la enfermedad inflamatoria, el cambio de forma de los neutrófilos es necesario para su reclutamiento hasta el sitio de acción. Un ensayo de cambio de forma de granulocitos humanos se diseñó para imitar esta respuesta biológica por medio del uso de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para medir el cambio en la forma de los granulocitos aislados a partir de sangre después de su exposición a GM-CSF. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos IgG4 anti-GM-CSFR α de inhibir la respuesta de cambio de forma de los neutrófilos a GM-CSF, y los valores de IC₅₀ de los clones seleccionados se encontraban en el intervalo de aproximadamente 15 a 350 nM. Un anticuerpo representativo 28G5 neutralizó el GMCSF-R de cinomolgo en el ensayo de cambio de forma de granulocitos con una IC₅₀ de aproximadamente 5 nM. El anticuerpo murino 2B7 conocido además fue capaz de neutralizar la respuesta biológica resultante a partir de la unión de GM-CSF al receptor de cinomolgo.

La afinidad de unión del receptor de los anticuerpos se midió después por medio del uso del BIAcore, con valores calculados de K_D que estaban en el intervalo a partir de 32 a 377 nM.

55 **Optimización**

5 En un esfuerzo para mejorar la potencia de 28G5 se inició un programa de optimización. Las genotecas de anticuerpos se produjeron cuando se llevó a cabo la mutagénesis aleatoria de las CDR3 de V_H o V_L. Cada CDR3 se aleatorizó en dos bloques de 6 aminoácidos con el fin de cubrir toda la CDR, lo que produjo las genotecas H1 (bloque terminal N de 6 aa en VH CDR3), H2 (bloque terminal C de 6 aa en VH CDR3), L1 (bloque terminal N de 6 aa en VL CDR3) y L2 (bloque terminal C de 6 aa en VL CDR3). Las genotecas resultantes se sometieron a ciclos repetidos de selección para la unión al GM-CSFR α humano. Los clones aislados a partir de este proceso de selección se usaron después para construir una genoteca de fagos combinada que contenía scFv con las CDR3s de cadena pesada mutadas y las CDR3s de cadena ligera mutadas. Estas genotecas además se sometieron al mismo procedimiento de selección.

10 En cada etapa del proceso de optimización, scFv que fueron capaces de inhibir la unión de 28G5 IgG4 al receptor GM-CSF se identificó por medio del uso de un ensayo de competencia del epítipo con 28G5 y el receptor, y después se evaluaron en el ensayo de proliferación de TF-1, como se describe más abajo.

15 Después de la mutagénesis aleatoria de las secuencias de las CDR3 de la cadena pesada de 28G5, un panel de scFv se identificó con potencia de neutralización medible en el ensayo de TF-1. La mayoría de las mejoras de potencia se obtuvieron cuando el extremo 3' de la VH CDR3 se aleatorizó.

20 Después de la mutagénesis aleatoria de las secuencias de las CDR3 de la cadena ligera de 28G5, un panel de scFv se identificó con potencia de neutralización medible en el ensayo de TF-1. Todas las mejoras de potencia se obtuvieron cuando el extremo 3' de la V_L CDR3 se aleatorizó.

25 Después de la combinación de las genotecas de mutagénesis aleatoria de CDR3 de la cadena pesada y ligera, un panel de scFv se identificó con mayor potencia en el ensayo de proliferación de TF-1 sobre el parental scFv 28G5. Se aislaron scFv con mejoras de potencia de >60000 veces sobre el parental 28G5. Todas las combinaciones de las genotecas dieron lugar a scFv mejorado, es decir, H1/L1, H1/L2, H2/L1, H2/L2. Esto es de particular interés porque los scFvs no mejorados se aislaron a partir de la genoteca de L1.

30 **[0164]** Un panel de 19 scFv identificados durante la optimización de 28G5 se reformatearon y se expresaron como IgG4, por medio del uso de los métodos descritos anteriormente. El panel estaba compuesto de clones de los anticuerpos 1, 2 y 4 a 20. Algunos de los clones más potentes en este panel se obtuvieron a partir de las genotecas mutagenizadas de CDR3 de H y L combinadas. La anticuerpos IgG4 en este panel se evaluaron por su actividad en el ensayo de proliferación de TF-1 y se compararon con el anticuerpo murino 2B7 conocido. Todos los IgG4 optimizados fueron más potentes que 2B7 en este ensayo. En esta ocasión 2B7 tenía una IC50 calculada de aproximadamente 1.6 nM, mientras que los clones tenía valores de IC50 calculados que estaban en el intervalo de aproximadamente 1 pm a aproximadamente 1100 pM. Los datos se presentan en la Tabla 1 más abajo y se resumen como sigue a continuación:

35 IC50 <1500 pM Anticuerpos 1, 2 y 4 a 20
 IC50 <300 pM Anticuerpos 1, 2, 4-12 y 14-20

40 IC50 <60 pM Anticuerpos 1, 2, 4-6, 8-11, 14 y 16-20
 IC50 <10 pM Anticuerpos 1, 5, 6, 11 y 20.

45 La Figura 3 ilustra la potencia antagonista de dos anticuerpos representativos de la invención, el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 6, en comparación con el anticuerpo 2B7 conocido en el ensayo de proliferación de TF-1.

50 El sistema BIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor) se usó para evaluar los parámetros cinéticos de la interacción de algunas de las IgG4 de optimización guiada con el dominio extracelular de GM-CSF recombinante de purificación etiquetada. La afinidad de los anticuerpos se mejoró mucho, con valores de K_D a partir de 0.127 nM a aproximadamente 5 nM. Los datos se muestran en la Tabla 2. Se obtuvieron mejoras en ambas velocidades de asociación y disociación. La correlación entre la afinidad de las IgG4 para el dominio extracelular soluble de GM-CSFR α y su rendimiento en el ensayo de TF-1 fue muy bueno, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.85 (p<0.0001). Por vía de la comparación, la KD de 2B7 se calculó por separado y se demostró que era aproximadamente 7 nM.

55 Los anticuerpos IgG4 identificados durante la optimización de 28G5 se evaluaron en el ensayo de cambio de forma de los granulocitos humanos y se compararon con el anticuerpo murino 2B7 conocido. Todos los anticuerpos que se evaluaron en este ensayo (anticuerpos 1, 2, 5, 6, 9-11, 16 y 20) fueron muy potentes con las IC50 que en el intervalo a partir de 7.8 a 90 pM.

De éstos, los anticuerpos 1, 2, 5, 6, 9, 16 y 20 tenían las IC50 menores que 50 pM, y los anticuerpos 1, 2, 6, 16 y 20 tenían las IC50 menores que 25 pM. Nuestros anticuerpos fueron más potentes que 2B7, que tenía una IC50 de 477pM. Los datos se muestran en la Tabla 3. La Figura 4 ilustra la potencia antagonista de dos anticuerpos representativos de la invención, el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 6, en comparación con el anticuerpo 2B7 conocido en el ensayo de cambio de forma de los granulocitos humanos.

Los anticuerpos IgG4 identificados durante la optimización de 28G5 se evaluaron en el ensayo de cambio de forma de los granulocitos de cinomolgo. Todos los anticuerpos fueron capaces de neutralizar la actividad de GM-CSF en el receptor de cinomolgo así como en el receptor humano y todos los anticuerpos fueron más potentes que 2B7. El 2B7 tenía una IC50 de 26 pM mientras los anticuerpos representativos (Anticuerpo 6, Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2) del panel tenían valores de IC50 de 1.73, 2.03 y 3.2 pM, respectivamente.

Un panel de las IgG4 identificadas durante la optimización de 28G5 se evaluaron por su potencia de neutralización en el ensayo de liberación de TNF α de monocitos. Este ensayo pone a prueba su capacidad para inhibir la liberación del factor proinflamatorio TNF α a partir de monocitos humanos cuando se tratan con GM-CSF. Los anticuerpos 1, 2, 5, 6, 9 y 10 se probaron y todos eran activos en este ensayo y fueron capaces de neutralizar completamente la acción de GM-CSF en su receptor (IC50 se encontraba en el intervalo de aproximadamente 43 a 139) mientras que a una concentración de 333nM 2B7 sólo podía lograr 50% de la inhibición de la liberación de TNF α inducida por GM-CSF, lo que indica que este anticuerpo sólo es un inhibidor parcial en este ensayo. La Figura 5 ilustra la potencia antagonista de dos anticuerpos representativos de la invención en comparación con el anticuerpo 2B7 conocido en el ensayo de liberación TNF α de monocitos. Los datos se muestran en la Tabla 4 y se resumen como sigue a continuación:

<150 pM	Anticuerpo núms. 1, 2, 5, 6, 9 & 10
<110 pM	Anticuerpo núms. 1, 2, 5, 6 & 9
<100 pM	Anticuerpo núms. 1, 5, 6 & 9

Una característica de la enfermedad inflamatoria es el aumento de la supervivencia de los tipos de células inflamatorias en respuesta a señales particulares. Los granulocitos son capaces de sobrevivir durante más tiempo en presencia de GM-CSF y así la capacidad de los anticuerpos IgG4 aislados durante la optimización de 28G5 para inhibir esta respuesta se evaluó en un ensayo de supervivencia de granulocitos. Todas las IgG4 anti-GM-CSFR α a partir de la optimización guiada fueron activos en este ensayo, y las potencias de neutralización representativas (IC50) se encontraban en el intervalo a partir de 7.0 a 843.7pM. Esto es en contraste con el anticuerpo murino 2B7 conocido que fue completamente inactivo hasta una concentración de 83nM. La Figura 6 ilustra la potencia antagonista de dos anticuerpos representativos de la invención, el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 6, en comparación con el anticuerpo 2B7 conocido en el ensayo de supervivencia de granulocitos.

Estos datos, como se ilustra en las Figuras 3 a 6, indican que los anticuerpos tienen propiedades significativamente diferentes en comparación con el anticuerpo murino 2B7 conocido. Por ejemplo, los anticuerpos representativos de la invención inhiben la supervivencia de granulocitos y la proliferación de TF-1 estimulada con 7 pM GM-CSF en los ensayos de supervivencia de granulocitos y proliferación de TF-1 respectivamente, mientras que el 2B7 no inhibió la supervivencia de granulocitos pero inhibió la proliferación de TF-1 (aunque en menor medida que los anticuerpos). Los datos indican que los miembros de unión de la invención tienen una mayor afinidad y una capacidad mejorada para inhibir una variedad de efectos biológicos mediados a través de GM-CSF-R en comparación con los anticuerpos anti-GM-CSFR α conocidos.

La secuencia de aminoácidos obtenida de 28G5 y sus derivados se alinearon con las secuencias de línea germinal humana conocidas en la base de datos VBASE y se identificó la más cercana de línea germinal por la similitud de secuencia. La más cercana de línea germinal para el dominio VH de 28G5 y sus derivados se identificó como VH1 DP5. La 28G5 VH tiene 14 cambios a partir de la VH 1-24 (DP5) de línea germinal dentro de las regiones de marco. La más cercana a línea germinal para el dominio VL es Vlambdal VL 1-e (DPL8), que tiene solamente 5 cambios a partir de de la línea germinal dentro de las regiones de marco. Las regiones de marco de 28G5 y sus derivados se regresaron a la línea germinal mediante la mutagénesis dirigida al sitio para que se correspondan idénticamente a los anticuerpos humanos naturales. Todos excepto un aminoácido se pudo convertir a la línea germinal con sólo pequeños cambios en la potencia de anticuerpo. El aminoácido isoleucina en la posición 94 de la cadena pesada (por medio del uso de la numeración de Kabat, Kabat y otros, 1971) no se pudo cambiar a la treonina de la línea germinal sin una pérdida completa de la actividad. Este único cambio a partir de la línea germinal se mantuvo, por lo tanto en la región de marco del anticuerpo.

Un análisis completo de pA₂ de dos de los anticuerpos anti-GM-CSFR α , el Anticuerpo 6 y el Anticuerpo 1, se llevó a cabo en el ensayo de proliferación de TF-1. Los datos confirman que estos anticuerpos son antagonistas muy potentes en este sistema con los valores de de pA₂ calculados de -11.3 \pm 0.2 y -11.0 \pm 0.2 respectivamente (Figura 1).

Un análisis completo de pA₂ de uno de los anticuerpos anti-GM-CSFR α , el Anticuerpo 6, se llevó a cabo en el ensayo de cambio de forma de los granulocitos de cinomolgo y humanos. Los datos confirman que este anticuerpo es un antagonista muy potente en estos sistemas con los valores de pA₂ calculados de -10.58 y -10.78 en el ensayo en humano y en cinomolgo respectivamente (Figura 2).

El GM-CSF conduce a la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas en colonias de granulocitos y macrófagos en ensayos de agar semisólido. El Anticuerpo 6 y el Anticuerpo 1 de afinidad madurada, el mAc parental Anticuerpo 3 (28G5) y un control negativo (CAT001) se evaluaron por lo tanto por su capacidad para antagonizar la actividad específica de GM-CSF por medio del uso de células progenitoras derivadas a partir de la sangre periférica, en un ensayo de formación de colonia. Los datos presentados en la Figura 7 demuestran que ambos mAc de afinidad madurada representativos fueron potentes inhibidores de la formación de colonias hematopoyéticas *in vitro* mediada por el GM-CSF humano.

Los valores aproximados de la IC₅₀ fueron 0.08 μ g/ml (Anticuerpo 6) y 0.25 μ g/ml (Anticuerpo 1) para el mAc de afinidad madurada. Es interesante que el anticuerpo murino 2B7 conocido parecía tener poca o ninguna actividad inhibidora en este ensayo hasta una concentración de 66nM.

En experimentos de control el mAc no tuvo efecto en la formación de colonia mediada por la combinación de SCF + IL-3 + G-CSF como se esperaba y, en ausencia de citocinas, la formación de colonias fue insignificante (<4 colonias/cultivo).

Para el análisis *in vivo* de la actividad antagonista mAc específica de huGM-CSFR α , el trasplante de médula ósea a partir de ratones transgénicos (Tg) que expresan tanto la cadena α y la β de GM-CSFR humano en ratones de tipo salvaje se puede usar para generar animales quiméricos de forma que la expresión de huGM-CSFR transgénico se limita a las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea y así se semeja más al perfil de expresión del receptor endógeno. En estos ratones quiméricos Tg la administración de huGM-CSF conduce a un aumento en el peso del bazo y la marginación de los monocitos circulantes en sangre. El Anticuerpo 6 de afinidad madurada y un mAc de control negativo, CAT001 se evaluaron por su capacidad para antagonizar estas respuestas *in vivo* mediadas por GM-CSF. Para el análisis de dosis-respuesta 6 grupos de 5 ratones quiméricos Tg se trataron con 500 ng de huGM-CSF s.c dos veces al día por 4 días (días 1-4) y un séptimo grupo de control de cinco animales recibió sólo PBS. Cuatro de los 6 grupos de animales tratados con huGM-CSF recibieron el mAc de prueba (Anticuerpo 6) a 16 mg/kg, 5.3 mg/kg, 1.78 mg/kg o 0.59 mg/kg por D.O mientras un quinto grupo de animales tratados con huGM-CSF recibieron el control CAT001 a 16 mg/kg por D.O. Los resultados presentados en la Figura 8 demuestran que, en comparación con el control de PBS, el tratamiento con huGM-CSF indujo un aumento significativo en el peso del bazo y una disminución en los monocitos circulantes en sangre. Como se esperaba, el tratamiento con 16 mg/kg del control CAT001 no tuvo efecto ni en el aumento de peso del bazo o la disminución de los monocitos de la sangre. En contraste hubo un claro efecto dosis-respuesta tras el tratamiento con el mAc de prueba el Anticuerpo 6, a 16 mg/kg este anticuerpo suprimió el aumento de peso del bazo y, aunque de todas formas evidente, el efecto se redujo en gran medida a 0.59 mg/kg del mAc. La IC₅₀ parecería estar en alguna parte entre 0.59 mg/kg y 1.78 mg/kg. Un resultado similar se observó para la disminución de los monocitos circulantes inducida por GM-CSF - el tratamiento con el mAc de prueba el Anticuerpo 6 a 16 mg/kg abolió la disminución, mientras el mAc a 0.59 mg/kg tuvo sólo un impacto menor sobre esta respuesta. Estos datos muestran que el anticuerpo anti-GM-CSFR α es un antagonista de GM-CSFR α humano *in vivo*.

Para investigar adicionalmente las propiedades antiinflamatorias de estos anticuerpos anti-GM-CSFR α , el Anticuerpo 6 se evaluó en un ensayo de liberación de citocina de células mononucleares de sangre periférica. En este ensayo el TNF α y la IL-6 se pueden liberar endógenamente en dependencia del donante. En este ensayo el GM-CSF se produce además por las células endógenamente, en lugar de añadirse exógenamente, y por lo tanto los resultados observados en este ensayo representan la inhibición de los efectos biológicos de la unión de GM-CSF endógeno natural a su receptor.

Después de la administración del Anticuerpo 6 estas dos citocinas se inhibieron de manera dosis dependiente como se ilustra en la Figura 9. Estos datos indican que estos anticuerpos pueden inhibir la actividad de GM-CSF natural y que mediante la inhibición de la señalización de GM-CSF se pueden inhibir citocinas pro-inflamatorias claves, tales como la IL-6 y el TNF α , ambos que están implicados en un número de indicaciones inflamatorias tales como la artritis reumatoide.

Además, basado en este resultado con el Anticuerpo 6 se puede esperar que cada uno de los anticuerpos 1 a 20 además demostrara inhibición en este ensayo, ya que todos los anticuerpos 1 a 20 se cree que se unen a la misma región de GM-CSFR α .

5 **Mapeo de residuos importantes para el reconocimiento del antígeno y análisis de secuencias**

Se determinó la variabilidad de los residuos en posiciones en la secuencia del scFv del Anticuerpo 6 transformado a la línea germinal con el fin de identificar las posiciones que normalmente se conservan para la unión del ligando y las posiciones que son variables en un anticuerpo que aún conserva la actividad de unión al ligando.

10 Las posiciones que contribuyen a la unión del antígeno parecen ser los residuos de Kabat 27A, 27B, 27C, 32, 51, 52, 53, 90, 92 y 96 en el dominio VL y los residuos de Kabat 17, 34, 54, 57, 95, 97, 99 y 100B en el dominio VH.

15 Se identificaron siete posiciones que parecen ser importantes para la unión del antígeno: H95, H97, H99, H100B, L90, L92 y L96. Después se analizaron los residuos en estas posiciones en las secuencias de 160 variantes aisladas durante el proceso de optimización del anticuerpo 28G5, todos los cuales mostraron una mejora mínima de 5-veces en la potencia en el ensayo de proliferación de TF-1.

20 Los datos de la Tabla 5 más abajo resumen los diferentes aminoácidos (de 20 posibles) que se observaron en cada una de estas posiciones, y en L95A. Cuando las posiciones están fuertemente conservadas en los aminoácidos presentes en el 28G5 y/o el Anticuerpo 6, es una buena evidencia de que los aminoácidos son claves para la unión del antígeno. Por ejemplo, los residuos en las siguientes posiciones están muy conservados: H97, H100B, L90, L92.

Método

25 La secuencia de ADN que codifica el scFv del Anticuerpo 6 de afinidad madurada y transformado a la línea germinal se convirtió a formato de presentación en ribosoma, prácticamente como se describe en la ref. [101]. La PCR propensa a errores se realizó en la secuencia del Anticuerpo 6, por medio del uso de condiciones de mutación elevada (7.2 mutaciones por 1,000 bp) en el protocolo del fabricante (BD Bioscience), con el fin de crear una genoteca de secuencias variantes de 574D04 que contuvieran mutaciones puntuales aleatorias. Esta genoteca se expresó en los ribosomas y se incubó con GM-CSFR α de purificación-etiquetada para permitir que ocurriera la unión. Las variantes capaces de unirse al GM-CSFR α de purificación-etiquetada se capturaron y se extrajeron por medio del uso de perlas paramagnéticas recubiertas con proteína G (Dyna). Las variantes no unidas que permanecían en la población se añadieron a un grupo de cuatro anticuerpos anti-idiotipos biotinilados, que previamente se habían obtenido a partir de la gran genoteca de presentación en fago de anticuerpos humanos descrita en la ref. [102] y se conocía que se unen al scFv del Anticuerpo 6. Las variantes unidas por los anticuerpos anti-idiotipos biotinilados se capturaron con perlas de estreptavidina mientras que las variantes no unidas se lavaron. Este proceso se repitió para dos rondas adicionales de selección de presentación en los ribosomas, se siguió la metodología general de la ref. [101].

40 Una proporción representativa de las variantes a partir de la salida de la selección se clonó en un vector fagémido y las variantes del scFv se expresaron en el fago para la prueba por ELISA, por medio del uso del mismo método que se describe en Edwards BM y otros(2003) Journal of Molecular Biology Vol 334:103. Las variantes que no presentaron unión al GM-CSFR α de purificación-etiquetada se probaron para la unión al grupo de cuatro anticuerpos anti-idiotipos que se usaron en la selección. Las variantes que, en el ensayo de unión anti-idiotipo, demostraron que la unión era igual o mayor que para el scFv del Anticuerpo 6 scFv se secuenciaron y las secuencias se analizaron para encontrar las posiciones en las que había una alta frecuencia de mutación.

45 Se encontró que la tasa de mutación promedio de la población de variantes era de 3.05 aminoácidos por cadena V_H o V_L, usando 486 secuencias para las cadenas V_H y 451 secuencias para las cadenas V_L. Se analizaron los puntos calientes mutacionales, y se realizó la representación gráfica de la frecuencia de mutación en relación con su posición a lo largo del scFv. El análisis se enfocó en aquellos clones con al menos una mutación CDR por V_H y V_L y menos de 4 mutaciones por V_H y V_L. A partir de este panel de secuencias de 123 V_H y 148 V_L, los puntos calientes se definieron como aquellos que tenían una frecuencia mutacional de 5% o más.

50 Siete posiciones dentro de V_HCDR3 y V_LCDR3 del Anticuerpo 6 se destacaron como posiciones putativas importantes para la unión del antígeno por medio del uso del método de selección negativa de presentación en ribosoma. Un análisis se

realizó después en 160 variantes de secuencia aisladas durante el proceso de optimización del anticuerpo 28G5, en el que la secuencia entera de V_HCDR3 y la V_LCDR3 se aleatorizaron y se seleccionaron para una mayor afinidad. Todas las secuencias (que incluyen el Anticuerpo 6) son variantes de 28G5 que mostraron una mejora mínima de 5 veces en la potencia en el ensayo de proliferación de TF-1.

5 **Determinación del epítipo lineal**

Se examinó el Anticuerpo 6 y el anticuerpo 2B7 conocido contra 2442 péptidos, cada uno representaba regiones cortas de secuencia de aminoácidos a partir de la porción extracelular de GM-CSFR- α , por medio del uso de un método PEPSCAN. Las señales de unión para cada anticuerpo contra todos los péptidos se promediaron para generar una señal de fondo media y para cada péptido se calculó una relación señal / fondo. Para ambos, el Anticuerpo 6 y 2B7 una relación señal / fondo de cuatro o mayor se consideró como una señal específica, positiva. Las secuencias de péptidos que dan señal específica, positiva se analizaron para motivos de unión conservados y se encontró que el Anticuerpo 6 se unía preferentemente a un motivo YLDFQ, correspondiente a los residuos 226 a 230 de GM-CSFR α humano maduro, y el anticuerpo 2B7 se unía preferencialmente a un motivo DVRI, correspondiente a los residuos 278 a 281 de GM-CSFR α humano maduro. La numeración de la secuencia de aminoácido para el receptor maduro es como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 206.

Método PEPSCAN (exploración de péptido de unión)

Péptidos sintéticos de superposición principalmente de 15-mer que tenían secuencias obtenidas a partir de GMCSF se sintetizaron y examinaron por medio del uso de mini tarjetas PEPSCAN de formato de tarjetas de crédito (455-pocillos-placa con pocillos de 3 ul) como se describió previamente [103]. La unión de los anticuerpos a cada péptido se probó en un ensayo inmunoenzimático (ELISA) basado en PEPSCAN. Las tarjetas de polipropileno de 455-pocillos de formato de tarjetas de crédito que contenían los péptidos unidos covalentemente se incubaron con la muestra (por ejemplo, 10 ug/ml del anticuerpo o el suero diluido 1/1000 en una solución de PBS que contenía 5% de suero de caballo (v/v) y 5% de ovalbúmina (p/v) y 1% de Tween 80 o en caso de bloqueo leves en una solución de PBS con 4% de suero de caballo (v/v) y 1% de Tween 80 (4°C, durante la noche). Después del lavado, los péptidos se incubaron con un anticuerpo anti-peroxidasa (dilución 1/1000, por ejemplo de conejo anti-peroxidasa de ratón, Dako) (1 hr, 25°C), y posteriormente, después de lavar el sustrato de la peroxidasa 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato (ABTS), se añadieron 2 ul/ml de H₂O₂ 3% . Después de 1 hora el desarrollo de color se midió. El desarrollo del color de la prueba ELISA se cuantificó con una cámara CCD y un sistema de procesamiento de imágenes. La instalación consta de una cámara CCD y una lente de 55 mm (Sony CCD Video Camara XC-77RR, lente Nikon micro-nikkor 55 mm f/2.8), un adaptador de cámara (Sony Camara adaptor DC-77RR) y el paquete de software de procesamiento de imágenes Optimas, versión 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, Estados Unidos). Optimas se ejecuta en un sistema de computadora pentium.

Materiales y Métodos del Ensayo

Ensayo bioquímico de unión al ligando

Las preparaciones de scFv purificadas se prepararon como se describe en el Ejemplo 3 de W001/66754 [104]. Las concentraciones de proteína de las preparaciones de scFv purificados se determinaron por medio del uso del método BCA [105]. Las placas de microtitulación de 96 pocillos Fluoronunc™ se recubrieron durante la noche a 4°C con 50 μ l/pocillo de una IgG4 anti-humana diluida a 2.5 μ g/ml en PBS. Las placas se lavaron 3 veces con 300 μ l/pocillo de PBS/0.1% Tween-20 antes de bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente con 300 μ l/pocillo de 3% BSA en PBS. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces con 300 μ l/pocillo de PBS/0.1% Tween-20 y después 50 μ l de GM-CSFR α humano diluido a 62.5ng/ml en 1% BSA/PBS se añadió a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces como se describió anteriormente, 25 μ l de material de muestra se añadió a cada pocillo seguido por 25 μ l de GM-CSF biotinilado diluido a 2nM en 1% BSA/PBS. Para definir la unión total, sólo el amortiguador se usó como material de muestra. Para definir la unión no específica, GM-CSF no etiquetado diluido a 100nM en 1% BSA se usó como material de muestra. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de lavar 3 veces como se describió anteriormente. 50 μ l de estreptavidina etiquetada con europio (PerkinElmer) diluida a 100ng/ml en el amortiguador de ensayo DELFIA™ se añadió a cada pocillo de la placa y se incubó durante 30-60 minutos a temperatura ambiente antes de lavar 7 veces con el amortiguador de lavado DELFIA™. 50 μ l/pocillo de la solución de intensificación DELFIA™ se añadió a las placas y las muestras se leyeron a 615nm en un lector de placas.

Ensayo de proliferación de TF-1

Las células TF-1, obtenidas a partir de R&D Systems mantenidas rutinariamente en medio RPMI 1640, FBS 10%, piruvato sódico 1mM y GM-CSF 4ng/ml, se privaron de nutrientes mediante 3 lavados en el medio de ensayo (RPMI 1640, 5% FBS, 1mM piruvato sódico), se resuspendieron en el medio de ensayo y se incubaron por 7-24 horas a 37°C en 5% CO₂. Las células después se resuspendieron en 1x10⁵/ml en el medio de ensayo y 100µl se añadieron a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. Las muestras de ensayo se prepararon mediante filtración estéril de la muestra madre antes de diluirla en el medio de ensayo. 50µl del material de prueba se añadió después a cada pocillo de células y éstas se incubaron durante 45-60 min. a 37°C en 5% CO₂. 50µl de GM-CSF diluido al valor de la EC₈₀ en medio de ensayo (o 0.4ng/ml para lotes de GM-CSF) se añadió después a cada pocillo y las placas se incubaron durante 16 horas a 37°C en 5% CO₂ en una cámara humidificada. Esto representa una concentración final de 7 pM de GM-CSF. Con el fin de medir la proliferación de las células, 20µl de ³H-timidina diluida a 5.0µCi/ml en medio de ensayo se añadió a cada pocillo de la placa y las placas se incubaron durante 4 horas ± 30 min. a 37°C en 5% CO₂. Las células después se cosecharon en placas de 96 pocillo GF/C Unifilter™ por medio del uso de una cosechadora de placa y se lavaron. Después de la adición de 50µl de MicroScint 20™ a cada pocillo de la placa de filtro, las placas se sellaron y se contaron en un lector de placas TopCount.

Ensayo de cambio de forma del granulocito humano

La capa leucocitaria humana (bolsa de sangre humana del servicio de transfusión de sangre) se mezcló en un volumen igual de dextrano T-500 3% en NaCl 0.9% . La mezcla se incubó después en una posición vertical hasta que se formó una interfase. La capa superior se cosechó y se estratificó en la parte superior de un gradiente de densidad histopaque 1.077 que después se centrifugó a 400g por 40 minutos y se dejó parar sin frenar. Las capas superiores de este gradiente se extrajeron y se dejó el sedimento de granulocitos. Los glóbulos rojos restantes en el sedimento se lisaron mediante resuspensión de las células en 20ml de agua helada durante 30s seguido de la adición inmediata de cloruro de sodio 1.8% helado. Las células después se resedimentaron a 1200rpm y se resuspendieron en medio de ensayo (RPMI1640, FBS 10%, penicilina 100u/ml, estreptomycin 100µg/ml , HEPES 25 mM) a 1x10⁶/ml. 100µl de las células después se añadieron a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. Las muestras de ensayo se prepararon mediante la filtración estéril y dilución de la muestra madre, según fuera apropiado, en medio de ensayo.

Para el aislamiento guiado, 50µl de la muestra de prueba se añadió después a las células y las placas se incubaron por 45-60 min. a 37°C en 5% CO₂. Este representa una concentración final de 7 pM de GM-CSF. A esto sigue la adición 50µl de GM-CSF diluido a 0.4ng/ml en medio de ensayo a cada placa y 4 horas de incubación a 37°C en 5% CO₂ en una cámara humidificada.

Para la optimización guiada, las IgG4s filtradas, diluidas en medio de ensayo se mezclaron con un volumen igual de GM-CSF a 0.4ng/ml en medio de ensayo. Esto representa una concentración final de GM-CSF de 7 pM. 100µl de la mezcla anticuerpo/GM-CSF se añadió después a cada pocillo. Esto fue seguido por 3 horas de incubación a 37°C en 5% CO₂ en una cámara humidificada.

El formaldehído frío se añadió a una concentración final de 1.25% y las células se fijaron durante la noche a 4°C. Se analizaron 2000-5000 eventos por pocillo por citometría de flujo. La media geométrica de la dispersión frontal (FSC) para cada muestra se obtuvo entonces por medio del uso de CellQuest. Las células se seleccionaron para excluir poblaciones irrelevantes (por ejemplo, células muertas/residuos) en el cálculo de la media geométrica.

Ensayo de cambio de forma de granulocitos de Cinomolgo

Los anticuerpos se evaluaron en un ensayo que mide el cambio de forma de los granulocitos de cinomolgo después de la estimulación con GM-CSF. Los granulocitos se purificaron a partir de sangre entera de cinomolgo y el ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe para el ensayo de cambio de forma de los granulocitos humanos.

Datos de afinidad de unión por medio del uso de análisis de biosensor

El sistema BIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor) se usó para evaluar los parámetros cinéticos de la interacción entre los scFvs y las IgG4s con los receptores recombinantes. El biosensor usa los efectos ópticos de la resonancia de plasmón

superficial para estudiar los cambios en la concentración de superficie que resultan a partir de la interacción de una molécula de analito con una molécula de ligando que está unida covalentemente a una matriz de dextrano. Típicamente las especies de analitos en solución libre se pasan sobre el ligando acoplado y cualquier unión se detecta como un aumento en la señal SPR local. A esto le sigue un período de lavado, durante el que la disociación de la especie analito se ve como una disminución en la señal de SPR, después de lo cual se elimina del ligando cualquier analito que queda y el procedimiento se repite en varias concentraciones de analitos diferentes. Una serie de controles se emplean normalmente durante un experimento para asegurar que ni la capacidad de unión absoluta o el perfil cinético del ligando acoplado cambian de manera significativa. Una propiedad del amortiguador salino HEPES (HBS-EP) se usa típicamente como el diluyente principal de las muestras de analito y el disolvente de la fase de disociación. Los datos experimentales se graban en unidades de resonancia (que se corresponde directamente a la señal de SPR) con respecto al tiempo. Las unidades de resonancia son directamente proporcionales al tamaño y la cantidad de analito unido. El paquete de software BIAevaluation se puede usar después para asignar la constante de velocidad a la fase de disociación (unidades de velocidad de disociación s^{-1}) y la fase de asociación (unidades de velocidad de asociación $M^{-1} s^{-1}$). Estas figuras después permiten el cálculo de las constantes de afinidad de asociación y disociación.

La afinidad de la IgG4 se estimó por medio del uso de un único ensayo en el que la IgG4 se capturó de manera no covalente por la amina de la superficie de la proteína A. Una serie de diluciones del dominio extracelular del receptor de GM-CSF recombinante de purificación etiquetada, a partir de 100 a 6.25nM se pasaron después secuencialmente sobre la IgG4. La molaridad del receptor se calculó por medio del uso de la concentración (Bradford) y la masa del polipéptido maduro no modificado después de la traducción prevista (39.7 kDa). Cada uno de los dos conjuntos separados de datos se analizaron en formatos idénticos. Los datos corregidos de célula de referencia se ajustaron por medio del uso del modelo de Langmuir 1:1 fijado para el cálculo global simultáneo de las velocidades de asociación y disociación, con el valor de R_{max} fijado a global. El nivel de IgG4 capturado durante cada ciclo se evaluó para garantizar que la cantidad capturada se mantuviera estable durante todo el experimento. Además, la velocidad de disociación de la IgG4 se evaluó para determinar si se requería una corrección de la deriva de la línea base. Sin embargo, ambas interacciones de la proteína A demostraron ser suficientemente reproducibles y estables. La validez de los datos se vio limitada por el valor calculado de χ^2 y T (valor de parámetro /compensación), que tuvo que ser <2 y >100 respectivamente.

La producción del dominio extracelular de GM-CSFR α de purificación-etiquetada: Un vector de expresión pEFBOS [106] con la incorporación de una secuencia que codifica el dominio extracelular del receptor α de GM-CSF humano (sec. con núm. de ident.: 205, que representa los aminoácidos 1 a 298 de GM-CSF R maduro) con una secuencia señal de IL-3 murina y la incorporación de una etiqueta de purificación N-terminal se usó para producir el polipéptido del dominio extracelular (ECD) del receptor GM-CSF recombinante etiquetado en N-terminal. El polipéptido ECD etiquetado se expresó en células CHO por medio del uso del vector pEFBOS y por medio del uso de procedimientos estándar. Este polipéptido además se puede denominar como dominio extracelular de GM-CSFR α purificado, o como el dominio extracelular de GM-CSFR α soluble.

Cualquier etiqueta de purificación adecuada se puede usar por ejemplo, el péptido Flag (DYKDDDE - sec. con núm. de ident.: 204), el Fc, la biotina o su etiqueta. La purificación puede llevarse a cabo por medio del uso de cualquier técnica adecuada, por ejemplo, un polipéptido ECD etiquetado con Flag (sec. con núm. de ident.: 203) se puede purificar en una columna de cromatografía de afinidad M2 y eluir con el péptido FLAG.

Ensayo de liberación de TNF α de monocito

La purificación de monocitos (kit de aislamiento de monocitos - Miltenyi Biotec - 130-053-301): Las capas leucocitarias (bolsa de sangre humana a partir del servicio de transfusión de sangre) se estratificaron en la parte superior de un gradiente de densidad histopaque 1.077 (Sigma, Cat No. 1077-1) y las células se centrifugaron a 400xg por 40 minutos. No se aplicó freno cuando se detuvo la centrifuga. Las células PBMC después se cosecharon a partir de la interfase. Las células se lavaron en PBS y se sedimentaron a 300xg por 10 min. antes de que los glóbulos rojos restantes se lisaran por resuspensión en 20ml de agua helada por 15s seguido de la adición inmediata de NaCl 1.8% helado. Las células se sedimentaron después a 1200rpm por 5 min. y se resuspendieron en 600 μ l del amortiguador MACS (PBS, 2mM EDTA). 200 μ l de reactivo de bloqueo de Fc proporcionado con el kit se añadió a las células y se mezcló antes de la adición de 200 μ l de cóctel hapteno-anticuerpo (proporcionado además con el kit) y se mezcló. Las células después se incubaron a 4°C por 15 min. antes lavar dos veces en 50ml del amortiguador MACS. El sedimento celular se resuspendió en 600 μ l del amortiguador MACS antes de la adición de 200 μ l de reactivo de bloqueo de Fc y se mezcló seguido por 200 μ l de microperlas anti-hapteno MACS y se mezcló. Las células se incubaron durante 45 min. a 4°C antes del lavado en 50ml del amortiguador MACS y resuspensión en 500 μ l del amortiguador MACS. Una sola columna (Miltenyi Biotec 130-042-401) se preparó lavando completamente con 3ml del amortiguador MACS antes de que la suspensión de células se aplicara a la columna. El efluente

se recogió como la fracción enriquecida de monocitos. La columna se lavó con 2x3ml del amortiguador MACS y el efluente se recogió. La pureza de los monocitos se comprobó mediante tinción con anti-CD14-PE por medio del uso de métodos estándar de citometría de flujo. Las células se resuspendieron finalmente en 4×10^6 /ml en medio de ensayo (RPMI 1640, 10% FCS, 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomycin).

5

Estimulación de monocitos: 50µl de células se añadieron a cada pocillo de una placa Costar de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano. 25µl de rhIFN γ 150µg/ml (R&D systems) se añadió a todos los pocillos. Las IgG4 filtradas diluidas en medio de ensayo se mezclaron con un volumen igual de GM-CSF a 56ng/ml (4nM) en medio de ensayo. Esto representa una concentración final de GM-CSF de 1 nM. 75µl de la mezcla anticuerpo/GM-CSF se añadió después a cada pocillo. Los controles fueron pocillos con GM-CSF solo o sin GM-CSF y sin anticuerpo. Las placas se incubaron entonces durante 18 horas a 37°C con 5% CO $_2$ en una cámara humidificada. El sobrenadante después se cosechó para la prueba de los niveles de TNF- α por ELISA.

10

15

ELISA de TNF α (R&D Systems ELISA Development System DY210): Las placas de ELISA Fluoronunc Immunosorb se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente con 100µl de anticuerpo de captura 4µg/ml en PBS. Las placas se lavaron después tres veces con PBS/0.1% Tween y se bloquearon con 300µl/pocillo de 3% Marvel en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/0.1% Tween. 100µl del sobrenadante a partir de las placas de ensayo se transfirieron a la placa de ELISA y se añadió a los pocillos de control una titulación de TNF- α diluido en el medio de ensayo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas antes de lavar 4-5 veces con PBS/0.1% Tween. 100µl del anticuerpo de detección diluido a 300 ng/ml en 1% Marvel/PBS se añadieron a cada pocillo de la placa y las placas se incubaron durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente antes de lavar 4-5 veces con PBS/0.1% Tween. La estreptavidina-europio (PerkinElmer 1244-360) se diluyó 1:1000 en el amortiguador de ensayo DELFIA (PerkinElmer 4002-0010) y se añadieron a 100µl/pocillo antes de incubar durante 45min. a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 7 veces en el amortiguador de lavado DELFIA antes de la adición de 100µl/pocillo de solución intensificadora (PerkinElmer 4001-0010) y se leyeron a 615nm en un lector de placas.

20

25

Ensayo de supervivencia de granulocito

Las células se purificaron a partir de la capa leucocitaria humana como se describe para el ensayo de activación de neutrófilos (ensayo de cambio de forma) se lavó en medio de ensayo (RPMI-1640 Glutamax, 10% FBS, 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomycin) y se resuspendieron a 1×10^6 /ml en medio de ensayo. 100µl de células se añadieron a cada pocillo de una placa Costar de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano. Las soluciones madre de anticuerpos filtradas se diluyeron en medio de ensayo se mezclaron con un volumen igual de GM-CSF a 0.4ng/ml. Esto representa una concentración final de GM-CSF de 7 pM. Los pocillos de control contenían medio sólo o GM-CSF sólo. 100µl de la mezcla muestra de prueba/GM-CSF se añadieron después a cada pocillo en la placa y las células se incubaron por 68 horas a 37°C/5% CO $_2$ en una cámara humidificada. 20µl de AlamarBlue se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron por otras 24 horas a 37°C/5% CO $_2$ en una cámara humidificada. Las placas se leyeron después a 560nm y 590nm en un lector de placas.

30

35

Análisis pA $_2$ de los anticuerpos anti-GM-CSFR α en el ensayo de proliferación de TF-1 y en los ensayos de cambio de forma de granulocitos de cinomolgo y humano

La herramienta farmacológica principal para cuantificar la afinidad de un antagonista competitivo es el análisis de Schild. Por medio del uso de este enfoque de un medio independiente del sistema de estimación de la afinidad de los antagonistas en un ensayo funcional se puede determinar. El método se basa en el concepto de que la concentración de antagonista y su afinidad determinan el antagonismo de la respuesta agonista. Debido a que el antagonismo se puede cuantificar y la concentración del antagonista se conoce, la afinidad del antagonista se puede determinar. Este antagonismo se cuantifica mediante la medición de la relación de concentraciones equiactivas de los agonistas, medido en presencia y ausencia del antagonista, denominadas proporciones de dosis (DR).

40

45

Las relaciones de dosis se pueden calcular tomando la relación de la EC50 del agonista (típicamente GM-CSF) en ausencia del miembro de unión a la EC50 del agonista en presencia de una concentración única del miembro de unión. Las relaciones de dosis, expresadas como log(DR-1) después se pueden usar en una regresión lineal en log[miembro de unión] para producir una regresión de Schild. Así, para cada concentración del miembro de unión habrá un correspondiente valor de DR; estos se representan gráficamente como la regresión de log (DR-1) sobre log [miembro de unión]. Si el antagonismo es

50

competitivo, habrá una relación lineal entre $\log(DR-1)$ y \log [miembro de unión] de acuerdo con la ecuación Schild en donde la ecuación es la siguiente

$$\text{Log}(DR-1) = \log [A] - \log K_A$$

- 5 Bajo estas circunstancias, un valor de cero para la ordenada dará un intercepto del eje-x en donde $\log [a] = \log K_A$. Por lo tanto la concentración del miembro de unión que produce $\log(DR-1) = 0$ será igual al $\log K_A$, la constante de equilibrio de disociación del complejo miembro de unión - receptor. Esta es una cuantificación independiente del sistema de la afinidad del miembro de unión que debe ser exacta para cada sistema celular que contiene el receptor.
- 10 Debido a que los valores de K_A se obtuvieron a partir de una representación gráfica logarítmica, ellos son una distribución logarítmica normal. El logaritmo negativo de esta concentración particular se refiere empíricamente como pA_2 , la concentración de antagonista que produce un cambio de dos veces de la curva de dosis respuesta del agonista. La potencia antagonista se puede cuantificar mediante el cálculo de pA_2 a partir de una única concentración de antagonista que produce un único valor para la relación de dosis a partir de la ecuación, en donde

$$15 \quad pA_2 = \log(DR-1) - \log[a]$$

[a] = la concentración molar del antagonista que hace necesario duplicar la concentración de agonista para provocar la respuesta submáxima original.

- 20 DR = la relación de la dosis se cuantifica mediante la medición de la relación de concentraciones equiactivas del agonista medida en presencia y ausencia del antagonista.

[0214] La pA_2 se puede calcular a partir de los datos del ensayo de dosis-respuesta.

25 ***Inhibición in vitro de la diferenciación de los progenitores de las células sanguíneas mediada por el GM-CSF en el ensayo de formación de colonias***

- Las células mononucleares de sangre periférica enriquecidas por las células progenitoras hematopoyéticas se obtuvieron a partir de donantes que se habían sometido a la movilización de células progenitoras y aféresis como parte de su manejo clínico estándar. Las muestras se de-identificaron y las células no se crioconservaron antes de su uso. 5×10^4 las células mononucleares se cultivaron en agar semisólido [107] en presencia de GM-CSF humano a una concentración final de 10 ng/ml. Para la prueba de afinidad los mAc humanos madurados, y el anticuerpo murino conocido 2B7, se añadieron a cultivos de agar a una concentración final de 10, 5, 1, 0.5, 0.1 ó 0.05 $\mu\text{g/ml}$. El mAc parental humano 28G5 y un isotipo que se ajustaba al mAc humano de control negativo, CAT001, se evaluaron a una concentración única de 10 $\mu\text{g/ml}$. Para fines de control los mAc se evaluaron además por su capacidad de bloquear la formación de colonias estimulada por una combinación de SCF, IL-3 y G-CSF (Croker y otros., 2004) y por su impacto sobre la formación de colonias en ausencia de citocinas. La formación de colonias (agregados de > 40 células) se evaluó después de 14 días de incubación a 37°C con 10% CO2 en aire. Las colonias se fijaron con glutaraldehído y se contaron por medio del uso de un microscopio de disección con un aumento de 35X.

35 ***Inhibición de la actividad biológica de GM-CSF in vivo en ratones transgénicos de GM-CSFR $\alpha\beta$***

- Ratones transgénicos (Tg) que expresaban ambas cadenas de GM-CSFR humano la α y después la β bajo el control de un promotor de MHC clase I se generaron y se describieron *in vivo* las respuestas de las células de bazo y sangre a la administración de huGM-CSF [108]. Para el análisis *in vivo* de la actividad antagonista del mAc específico del huGM-CSFR α , se puede usar el trasplante de médula ósea de los ratones Tg en los ratones de tipo salvaje para generar animales quiméricos de forma que la expresión del huGM-CSFR $\alpha\beta$ transgénico está limitada a las células hematopoyéticas obtenidas de médula ósea y así se asemeja más el perfil de expresión del receptor endógeno. En estos ratones quiméricos Tg huGM-CSFR $\alpha\beta$ la administración de huGM-CSF conduce a un aumento del peso del bazo y la marginación de los monocitos circulantes en sangre.

5 Generación de ratones quiméricos Tg: los fémures y tibias a partir de los ratones Tg donantes se retiraron y la médula ósea se enjuagó con PBS estéril más 3% de suero fetal de terneros). Los tapones de médula ósea se extrajeron después a través de una aguja 23G para obtener una suspensión de células individuales, después las células se lavaron una vez con PBS frío + 3% de FCS y se pasó a través de una malla de acero inoxidable. Los glóbulos rojos después se retiraron mediante la lisis en el amortiguador cloruro de amonio 0.168 M, después de lo cual las células se lavaron dos veces más con solución salina regulada con fosfato (PBS) + 3% de FCS antes de pasarla de nuevo a través de una malla de acero inoxidable. Para adicionalmente eliminar las células muertas y los residuos de células se centrifugó la suspensión a través de un cojín de FCS. Las células viables se recuperaron en el sedimento, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en PBS a 2.5×10^7 /ml. Los ratones C57/BL6 receptores de 5 a 8 semanas de edad se irradiaron letalmente con 2 dosis de 550 Rad, 3 horas de diferencia. Los ratones receptores se inyectaron por vía intravenosa (i.v) con 0.2 ml de la suspensión de células (es decir, 5×10^6 células/ratón) y posteriormente alojados en cajas encapuchados con neomicina 0.02 M en su agua potable durante 3 semanas. La reconstitución se evaluó después de 6 semanas mediante el análisis en FACS de la sangre periférica por medio del uso de los mAc's específicos para las cadenas α y β del huGMCSFR.

15 Tratamiento de GM-CSF y el posterior análisis de los ratones quiméricos Tg: los ratones quiméricos Tg se trataron dos veces diariamente a través de la vía subcutánea (s.c) con 500 ng de huGM-CSF por 4 días. Para el análisis de la actividad antagonista de los anticuerpos, se le administró a grupos de 5 ratones las dosis seleccionadas del mAc (ver más abajo) a través de la vía intraperitoneal (ip) 1 días antes de la iniciación del tratamiento de GM-CSF. En el día 5, se tomaron muestras de 0.2 ml de sangre se tomaron muestras para el análisis de poblaciones de leucocitos circulantes, particularmente los monocitos de la sangre, por medio del uso de sistema de hematología ADVIA™ (Bayer Diagnostics). Los animales después se sacrificaron y los bazos se retiraron para la medición del peso .

25 La inhibición del TNFa y la IL-6 humanos expresados endógenamente a partir de las células mononucleares de sangre periférica humana de la capa leucocitaria humana (bolsa de sangre humana desde el servicio de transfusión de sangre) se dispusieron en capas en la parte superior de un gradiente de densidad histopaque 1.077 (Sigma, Cat No. 1077-1) y las células se centrifugaron a 400xg durante 40 minutos. No se aplicó el freno cuando se detuvo la centrifuga. Las células PBMC después se cosecharon a partir de la interfase. Las células se lavaron en PBS y se sedimentaron a 300xg por 10 min. antes de que los glóbulos rojos restantes se lisaran por resuspensión en 20ml de agua helada por 15s seguido de la adición inmediata de NaCl 1.6% helado. Las células después se sedimentaron a 1200rpm por 5 min. y se resuspendieron en 10ml de 10% FBS/RPMI y 1% penicilina estreptomycin. Las células se diluyeron después a 5×10^6 /ml. Se dispensaron 110 μ l de células por pocillo (5.5×10^5 /pocillo) y las células se dejaron sedimentar durante 1 hr a 37°C, 5% CO₂. Los siguientes reactivos se añadieron como controles de concentraciones finales individuales; PHA (5 μ g/ml), LPS (25 μ g/ml), GM-CSF (10ng/ml) y el control de isotipo (50 μ g/ml). El Anticuerpo 6 se añadió a una concentración final de partida de 50 μ g/ml con una serie de diluciones de cinco veces. Las placas después se incubaron durante 72hrs a 37°C, 5% CO₂. Los sobrenadantes se cosecharon después de 72hrs y se calcularon los niveles de TNFa e IL-6 por medio del uso de los siguiente kits de R&D ELISA (el sistema DY210 de desarrollo del ELISA R&D Duoset de hTNF-a, y el sistema DY206 de desarrollo del ELISA R&D Duoset de hIL-6). Los ELISA se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores.

40 *Tabla 1: Inhibición de la proliferación de las células TF-1 inducida por GM-CSF mediante los anticuerpos IgG4 que no se transformaron a la línea germinal aislados a partir de la optimización de 28G5. La proliferación de las células TF-1 se indujo con una concentración única de GM-CSF en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos IgG4. Se midió la incorporación de timidina tritiada y se calcularon los valores de IC50 para los anticuerpos. Los datos son representativos de ≥ 3 . Se muestra el SEM (error estándar de la media).*

IgG4	IC50 \pm SEM (pM)
2B7	1575 \pm 490.5
Anticuerpo 1	5.3 \pm 0.33
Anticuerpo 2	15.0 \pm 4.71
Anticuerpo 4	48.0 \pm 8.33
Anticuerpo 5	9.3 \pm 5.39
Anticuerpo 6	0.97 \pm 0.033
Anticuerpo 7	93.8 \pm 24.6

IgG4	IC50 ± SEM (pM)
Anticuerpo 8	34.5±2.63
Anticuerpo 9	40.8±7.15
Anticuerpo 10	55.3±3.73
Anticuerpo 11	9.0±1.0
Anticuerpo 12	246.3±19.8
Anticuerpo 13	1106.0±174.9
Anticuerpo 14	16.3±4.9
Anticuerpo 15	163.8±7.3
Anticuerpo 16	12.8±3.3
Anticuerpo 17	14.3±2.8
Anticuerpo 18	13.3±3.4
Anticuerpo 19	23.8±4.3
Anticuerpo 20	9.8±2.8

5 *Tabla 2: Análisis cinético de los anticuerpos IgG4 anti-GM-CSFR α que no se transformó a la línea germinal aislados durante la optimización de 28G5. Los anticuerpos IgG4 se inmovilizaron a la superficie de un chip recubierto con proteína-A y una serie de diluciones del ECD de GM-CSF R α de purificación etiquetada se pasaron sobre la IgG4. Los datos se ajustaron por medio del uso k_a k_d simultáneas de Langmuir 1:1 con el margen para el transporte de masa.*

IgG4	KD (nM)
Anticuerpo 1	0.264
Anticuerpo 2	0.376
Anticuerpo 4	4.07
Anticuerpo 5	0.847
Anticuerpo 6	0.139
Anticuerpo 7	3.93
Anticuerpo 8	0.552
Anticuerpo 10	1.50
Anticuerpo 12	3.02
Anticuerpo 14	0.502
Anticuerpo 15	1.03
Anticuerpo 16	1.14
Anticuerpo 17	0.193
Anticuerpo 19	0.388
Anticuerpo 20	0.127

Los datos para los anticuerpos 9 y 11 fueron bifásicos.

5 *Tabla 3: Inhibición del cambio de forma de los granulocitos humanos inducida por el GM-CSF mediante los anticuerpos IgG4 que no se transformaron a la línea germinal aislados durante la optimización de 28G5. Los granulocitos humanos se trataron con una concentración única GM-CSF en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo IgG4. El cambio en la forma de los granulocitos se midió por medio del uso de la citometría de flujo y se calcularon los valores de IC50 para los anticuerpos.*

IgG4	IC50 ± SD (pM)
2B7	477±491
Anticuerpo 1	12.6±8.0
Anticuerpo 2	20.7±11.0
Anticuerpo 5	30.0
Anticuerpo 6	13.3±11.8
Anticuerpo 9	44.0
Anticuerpo 10	62.0
Anticuerpo 11	90.0
Anticuerpo 16	16.0
Anticuerpo 20	7.8

10 *Tabla 4: Inhibición de la liberación de TNF α inducida por GM-CSF a partir de monocitos. Los monocitos humanos se trataron con una única concentración de GM-CSF en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos IgG4 que no se transformaron a la línea germinal. La liberación de TNF α se midió mediante ELISA y se calcularon los valores de IC50 para los anticuerpos.*

IgG4	IC50 ± SD (pM)
Anticuerpo 1	78.8±54.6
Anticuerpo 2	103.3±63.1
Anticuerpo 5	67.0
Anticuerpo 6	43.0±19.7
Anticuerpo 9	74.0
Anticuerpo 10	139.0

Tabla 5

Residuo de Kabat	1982		Porcentaje de ocurrencia de residuos																																				
	V	A	N	L	V																																		
H95			1.250	26.875	1.250	70.625																																	
H97	S	S	100.00																																				
H99	S	P	1.250	70.625	0.625	0.625	26.250	0.625																															
H100B	A	T	A	P	S	T	H	V																															
L90	S	T	S	T	M																																		
L92	D	B	S	T	D	Q	E	M																															
L95A	S	G	P	S	T	N	D	Q	E	R	H	K	J	L	M	V	F	Y																					
L96	S	S	A	P	S	T	I	L	M	V																													

Clave del Listado de Secuencias

5 En la lista de secuencias adjunta, las secuencias de ácido nucleico y aminoácido ("PRT") se enumeran para 20 clones de anticuerpos, que comprenden el clon parental y 19 clones a partir del panel optimizado. Los anticuerpos se numeran Ab1 a Ab20. El clon parental es el anticuerpo 3, representado por la sec. con núms. de ident.: 21-30 y sec. con núms. de ident.: 211-212.

La siguiente lista identificada por el número de la sec. con núms. de ident. en la cual las secuencias de las moléculas indicadas se muestran:

10 (nt = secuencia de nucleótido ; aa = secuencia de aminoácido

- 1 Anticuerpo 01 VH nt
- 2 Anticuerpo 01 VH aa
- 3 Anticuerpo 01 VH CDR1 aa
- 4 Anticuerpo 01 VH CDR2 aa
- 15 5 Anticuerpo 01 VH CDR3 aa
- 6 Anticuerpo 01 VL nt
- 7 Anticuerpo 01 VL aa
- 8 Anticuerpo 01 VL CDR1 aa
- 9 Anticuerpo 01 VL CDR2 aa
- 20 10 Anticuerpo 01 VL CDR3 aa
- 11 Anticuerpo 02 VH nt
- 12 Anticuerpo 02 VH aa
- 13 Anticuerpo 02 VH CDR1 aa
- 14 Anticuerpo 02 VH CDR2 aa
- 25 15 Anticuerpo 02 VH CDR3 aa
- 16 Anticuerpo 02 VL nt
- 17 Anticuerpo 02 VL aa
- 18 Anticuerpo 02 VL CDR1 aa
- 19 Anticuerpo 02 VL CDR2 aa
- 30 20 Anticuerpo 02 VL CDR3 aa
- 21 Anticuerpo 03 VH nt
- 22 Anticuerpo 03 VH aa
- 23 Anticuerpo 03 VH CDR1 aa
- 24 Anticuerpo 03 VH CDR2 aa
- 35 25 Anticuerpo 03 VH CDR3 aa
- 26 Anticuerpo 03 VL nt
- 27 Anticuerpo 03 VL aa
- 28 Anticuerpo 03 VL CDR1 aa
- 29 Anticuerpo 03 VL CDR2 aa
- 40 30 Anticuerpo 03 VL CDR3 aa
- 31 Anticuerpo 04 VH nt
- 32 Anticuerpo 04 VH aa
- 33 Anticuerpo 04 VH CDR1 aa
- 34 Anticuerpo 04 VH CDR2 aa
- 45 35 Anticuerpo 04 VH CDR3 aa
- 36 Anticuerpo 04 VL nt
- 37 Anticuerpo 04 VL aa
- 38 Anticuerpo 04 VL CDR1 aa
- 39 Anticuerpo 04 VL CDR2 aa
- 50 40 Anticuerpo 04 VL CDR3 aa
- 41 Anticuerpo 05 VH nt
- 42 Anticuerpo 05 VH aa
- 43 Anticuerpo 05 VH CDR1 aa
- 44 Anticuerpo 05 VH CDR2 aa
- 55 45 Anticuerpo 05 VH CDR3 aa
- 46 Anticuerpo 05 VL nt
- 47 Anticuerpo 05 VL aa

	48	Anticuerpo 05 VL CDR1 aa
	49	Anticuerpo 05 VL CDR2 aa
	50	Anticuerpo 05 VL CDR3 aa
	51	Anticuerpo 06 VH nt
5	52	Anticuerpo 06 VH aa
	53	Anticuerpo 06 VH CDR1 aa
	54	Anticuerpo 06 VH CDR2 aa
	55	Anticuerpo 06 VH CDR3 aa
	56	Anticuerpo 06 VL nt
10	57	Anticuerpo 06 VL aa
	58	Anticuerpo 06 VL CDR1 aa
	59	Anticuerpo 06 VL CDR2 aa
	60	Anticuerpo 06 VL CDR3 aa
	61	Anticuerpo 07 VH nt
15	62	Anticuerpo 07 VH aa
	63	Anticuerpo 07 VH CDR1 aa
	64	Anticuerpo 07 VH CDR2 aa
	65	Anticuerpo 07 VH CDR3 aa
	66	Anticuerpo 07 VL nt
20	67	Anticuerpo 07 VL aa
	68	Anticuerpo 07 VL CDR1 aa
	69	Anticuerpo 07 VL CDR2 aa
	70	Anticuerpo 07 VL CDR3 aa
	71	Anticuerpo 08 VH nt
25	72	Anticuerpo 08 VH aa
	73	Anticuerpo 08 VH CDR1 aa
	74	Anticuerpo 08 VH CDR2 aa
	75	Anticuerpo 08 VH CDR3 aa
	76	Anticuerpo 08 VL nt
30	77	Anticuerpo 08 VL aa
	78	Anticuerpo 08 VL CDR1 aa
	79	Anticuerpo 08 VL CDR2 aa
	80	Anticuerpo 08 VL CDR3 aa
	81	Anticuerpo 09 VH nt
35	82	Anticuerpo 09 VH aa
	83	Anticuerpo 09 VH CDR1 aa
	84	Anticuerpo 09 VH CDR2 aa
	85	Anticuerpo 09 VH CDR3 aa
	86	Anticuerpo 09 VL nt
40	87	Anticuerpo 09 VL aa
	88	Anticuerpo 09 VL CDR1 aa
	89	Anticuerpo 09 VL CDR2 aa
	90	Anticuerpo 09 VL CDR3 aa
	91	Anticuerpo 10 VH nt
45	92	Anticuerpo 10 VH aa
	93	Anticuerpo 10 VH CDR1 aa
	94	Anticuerpo 10 VH CDR2 aa
	95	Anticuerpo 10 VH CDR3 aa
	96	Anticuerpo 10 VL nt
50	97	Anticuerpo 10 VL aa
	98	Anticuerpo 10 VL CDR1 aa
	99	Anticuerpo 10 VL CDR2 aa
	100	Anticuerpo 10 VL CDR3 aa
	101	Anticuerpo 11 VH nt
55	102	Anticuerpo 11 VH aa
	103	Anticuerpo 11 VH CDR1 aa
	104	Anticuerpo 11 VH CDR2 aa
	105	Anticuerpo 11 VH CDR3 aa

	106	Anticuerpo 11 VL nt
	107	Anticuerpo 11 VL aa
	108	Anticuerpo 11 VL CDR1 aa
	109	Anticuerpo 11 VL CDR2 aa
5	110	Anticuerpo 11 VL CDR3 aa
	111	Anticuerpo 12 VH nt
	112	Anticuerpo 12 VH aa
	113	Anticuerpo 12 VH CDR1 aa
	114	Anticuerpo 12 VH CDR2 aa
10	115	Anticuerpo 12 VH CDR3 aa
	116	Anticuerpo 12 VL nt
	117	Anticuerpo 12 VL aa
	118	Anticuerpo 12 VL CDR1 aa
	119	Anticuerpo 12 VL CDR2 aa
15	120	Anticuerpo 12 VL CDR3 aa
	121	Anticuerpo 13 VH nt
	122	Anticuerpo 13 VH aa
	123	Anticuerpo 13 VH CDR1 aa
	124	Anticuerpo 13 VH CDR2 aa
20	125	Anticuerpo 13 VH CDR3 aa
	126	Anticuerpo 13 VL nt
	127	Anticuerpo 13 VL aa
	128	Anticuerpo 13 VL CDR1 aa
	129	Anticuerpo 13 VL CDR2 aa
25	130	Anticuerpo 13 VL CDR3 aa
	131	Anticuerpo 14 VH nt
	132	Anticuerpo 14 VH aa
	133	Anticuerpo 14 VH CDR1 aa
	134	Anticuerpo 14 VH CDR2 aa
30	135	Anticuerpo 14 VH CDR3 aa
	136	Anticuerpo 14 VL nt
	137	Anticuerpo 14 VL aa
	138	Anticuerpo 14 VL CDR1 aa
	139	Anticuerpo 14 VL CDR2 aa
35	140	Anticuerpo 14 VL CDR3 aa
	141	Anticuerpo 15 VH nt
	142	Anticuerpo 15 VH aa
	143	Anticuerpo 15 VH CDR1 aa
	144	Anticuerpo 15 VH CDR2 aa
40	145	Anticuerpo 15 VH CDR3 aa
	146	Anticuerpo 15 VL nt
	147	Anticuerpo 15 VL aa
	148	Anticuerpo 15 VL CDR1 aa
	149	Anticuerpo 15 VL CDR2 aa
45	150	Anticuerpo 15 VL CDR3 aa
	151	Anticuerpo 16 VH nt
	152	Anticuerpo 16 VH aa
	153	Anticuerpo 16 VH CDR1 aa
	154	Anticuerpo 16 VH CDR2 aa
50	155	Anticuerpo 16 VH CDR3 aa
	156	Anticuerpo 16 VL nt
	157	Anticuerpo 16 VL aa
	158	Anticuerpo 16 VL CDR1 aa
	159	Anticuerpo 16 VL CDR2 aa
55	160	Anticuerpo 16 VL CDR3 aa
	161	Anticuerpo 17 VH nt
	162	Anticuerpo 17 VH aa
	163	Anticuerpo 17 VH CDR1 aa

	164	Anticuerpo 17 VH CDR2 aa
	165	Anticuerpo 17 VH CDR3 aa
	166	Anticuerpo 17 VL nt
	167	Anticuerpo 17 VL aa
5	168	Anticuerpo 17 VL CDR1 aa
	169	Anticuerpo 17 VL CDR2 aa
	170	Anticuerpo 17 VL CDR3 aa
	171	Anticuerpo 18 VH nt
	172	Anticuerpo 18 VH aa
10	173	Anticuerpo 18 VH CDR1 aa
	174	Anticuerpo 18 VH CDR2 aa
	175	Anticuerpo 18 VH CDR3 aa
	176	Anticuerpo 18 VL nt
	177	Anticuerpo 18 VL aa
15	178	Anticuerpo 18 VL CDR1 aa
	179	Anticuerpo 18 VL CDR2 aa
	180	Anticuerpo 18 VL CDR3 aa
	181	Anticuerpo 19 VH nt
	182	Anticuerpo 19 VH aa
20	183	Anticuerpo 19 VH CDR1 aa
	184	Anticuerpo 19 VH CDR2 aa
	185	Anticuerpo 19 VH CDR3 aa
	186	Anticuerpo 19 VL nt
	187	Anticuerpo 19 VL aa
25	188	Anticuerpo 19 VL CDR1 aa
	189	Anticuerpo 19 VL CDR2 aa
	190	Anticuerpo 19 VL CDR3 aa
	191	Anticuerpo 20 VH nt
	192	Anticuerpo 20 VH aa
30	193	Anticuerpo 20 VH CDR1 aa
	194	Anticuerpo 20 VH CDR2 aa
	195	Anticuerpo 20 VH CDR3 aa
	196	Anticuerpo 20 VL nt
	197	Anticuerpo 20 VL aa
35	198	Anticuerpo 20 VL CDR1 aa
	199	Anticuerpo 20 VL CDR2 aa
	200	Anticuerpo 20 VL CDR3 aa
	201	Secuencia del residuo GM-CSFR α lineal
	202	Secuencia de aminoácido de longitud completa de GM-CSFR α humano
40	203	Dominio extracelular GM-CSFR α humano marcado FLAG
	204	péptido FLAG
	205	Secuencia de aminoácido del dominio extracelular GM-CSFR α humano
	206	GM-CSFR α maduro
	207	Anticuerpo 1 VL nt
45	208	Anticuerpo 1 VL aa
	209	Anticuerpo 2 VL nt
	210	Anticuerpo 2 VL aa
	211	Anticuerpo 3 VL nt
	212	Anticuerpo 3 VL aa
50	213	Anticuerpo 4 VL nt
	214	Anticuerpo 4 VL aa
	215	Anticuerpo 5 VL nt
	216	Anticuerpo 5 VL aa
	217	Anticuerpo 6 VL nt
55	218	Anticuerpo 6 VL aa
	219	Anticuerpo 7 VL nt
	220	Anticuerpo 7 VL aa
	221	Anticuerpo 8 VL nt

	222	Anticuerpo 8 VL aa
	223	Anticuerpo 9 VL nt
	224	Anticuerpo 9 VL aa
	225	Anticuerpo 10 VL nt
5	226	Anticuerpo 10 VL aa
	227	Anticuerpo 11 VL nt
	228	Anticuerpo 11 VL aa
	229	Anticuerpo 12 VL nt
	230	Anticuerpo 12 VL aa
10	231	Anticuerpo 13 VL nt
	232	Anticuerpo 13 VL aa
	233	Anticuerpo 14 VL nt
	234	Anticuerpo 14 VL aa
	235	Anticuerpo 15 VL nt
15	236	Anticuerpo 15 VL aa
	237	Anticuerpo 16 VL nt
	238	Anticuerpo 16 VL aa
	239	Anticuerpo 17 VL nt
	240	Anticuerpo 17 VL aa
20	241	Anticuerpo 18 VL nt
	242	Anticuerpo 18 VL aa
	243	Anticuerpo 19 VL nt
	244	Anticuerpo 19 VL aa
	245	Anticuerpo 20 VL nt
25	246	Anticuerpo 20 VL aa
	247	Anticuerpo 6 VH nt
	248	Anticuerpo 6 VH aa
	249	Anticuerpo 6 VL nt
	250	Anticuerpo 6 VL aa
30	251	VH FR1 aa
	252	VH FR2 aa
	253	VH FR3 aa
	254	VH FR4 aa
	255	VL FR1 aa
35	256	VL FR2 aa
	257	VL FR3 aa
	258	VL FR4 aa

40 Las secuencias de nucleótido del dominio VL de los anticuerpos 1 a 20 no incluyen el codón gcg mostrado en el extremo 3' en las sec. con núms. de ident.: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186 y 196. En correspondencia, las secuencias de aminoácido del dominio VL no incluyen el residuo Ala C-terminal (residuo 113) en las sec. con núms. de ident.: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187 y 197, respectivamente. El residuo Ala113 y el codón gcg correspondiente no se expresan en los Anticuerpos 1 a 20. Una comparación de las secuencias escritas con los segmentos de genes de línea germinal, especialmente JL2, indica que el residuo de Ala y el codón gcg correspondiente no forman parte del dominio VL.

45 El residuo Gly en la posición 112 estaba presente en las secuencias del ScFv expresado y la IgG. Sin embargo, este residuo no está presente en las secuencias del segmento j de la línea germinal que forma la región del marco 4 del dominio VL, por ejemplo, JL2. El residuo Gly no se considera una parte del dominio VL.

50 Para expresar la cadena ligera de la IgG, se proporcionó una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo, que comprende un primer exón que codifica el dominio VL, un segundo exón que codifica el dominio CL, y un intrón que separa el primer exón y el segundo exón. En circunstancias normales, el intrón se empalma por la maquinaria celular de procesamiento de ARNm, que une el extremo 3' del primer exón al extremo 5' del segundo exón. Así, cuando el ADN que tiene dicha secuencia de nucleótidos se expresa como ARN, los exones primero y segundo se empalman juntos.

55 La traducción de los ARN empalmados produce un polipéptido que comprende el dominio VL y el CL. Después del empalme, la Gly en la posición 112 está codificada por la última base (g) de la secuencia del marco 4 del dominio VL y las primeras dos bases (gt) del dominio CL.

Las secuencias de los dominios VL de los Anticuerpos 1 a 20 son las sec. con núms. de ident.: 186 a 246 como se indicó anteriormente. Las secuencias de nucleótido del dominio terminan con cta como codón final y la Leu es el residuo de aminoácido final en las correspondientes secuencias de aminoácidos del dominio VL.

- 5 Las secuencias de los dominios VH y VL no transformados a la línea germinal del Anticuerpo 6 se muestran en la sec. con núms. de ident.: 247 - 250, además de las secuencias de los dominios VH y VL transformados a la línea germinal que se muestran en la sec. con núms. de ident.: 51, 52, 56, 57, 216 y 217.

Referencias

1. Haman y otros, *Journal of Biological Chemistry* 274(48) :34155-34163 1999
2. Nicola NA; Wycherley A; Boyd AW; Layton JE; Cary D; Metcalf D *Blood*, 82(6) p1724-31 (1993)
3. Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991)
- 5 4. Chadd HE y Chamow SM (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194
5. Andersen DC y Krummen L (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117
6. Larrick JW y Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418
7. Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3ra edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 10 8. Ausubel y otros eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4ta edición 1999
9. Wold, y otros, *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holanda, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
10. Norman y otros, *Applied Regression Analysis*. Wiley-Interscience; 3ra edición (Abril 1998) ISBN: 0471170828
- 15 11. Kandel, Abraham & Backer, Eric. *Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis*. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847
12. Krzanowski, Wojtek. *Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective* (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (Diciembre 2000), ISBN: 0198507089
13. Witten, Ian H. & Frank, Eibe. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations*. Morgan Kaufmann; (Octubre 11, 1999), ISBN: 1558605525
- 20 14. Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K.
15. Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery*. ISBN: 0-8247-0487-8
16. Chothia C. Y otros, *Journal Molecular Biology* (1992) 227, 799-817
- 25 17. Al-Lazikani, y otros, *Journal Molecular Biology* (1997) 273(4), 927-948
18. Chothia, y otros, *Science*, 223,755-758 (1986)
19. Whitelegg, N.R.U. y Rees, A.R (2000). *Prot. Eng.*, 12, 815-824
20. Guex, N. y Peitsch, M.C. *Electrophoresis* (1997) 18, 2714-2723
21. Voet & Voet, *Biochemistry*, 2da Edición, (Wiley) 1995.
- 30 22. Marks y otros, *Bio/Technology*, 1992, 10:779-783
23. Kay, B.K., Winter, J., y McCafferty, J. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, San Diego: Academic Press.
24. Stemmer, *Nature*, 1994, 370:389-391
25. Gram y otros, 1992, *Proc. Natl Acad. Sci., Estados Unidos*, 89:3576-3580
- 35 26. Barbas y otros, 1994, *Proc. Natl Acad. Sci., Estados Unidos*, 91:3809-3813
27. Schier y otros, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567
28. Ledermann J.A. y otros, (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664
29. Bagshawe K.D. y otros, (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922
30. Robinson, J. R. ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978
- 40 31. Ritz, S. A., M. J. Cundall, y otros (2002). *Am J Respir Cell Mol Biol* 27(4): 428-35.
32. Ritz, S. A., M. R. Stampfli, y otros (2002). *Trends Immunol* 23 (8) : 396-402.
33. WOOLLEY, K.L., y otros (1995). *Am J Respir Crit Care Med*, 151, 1915-24.
34. Kotsimbos, A. T., M. Humbert, y otros (1997). *J Allergy Clin Immunol* 99(5): 666-72.
- 45 35. Yamashita N. y otros, *Cell. Immunol* 2002 oct; 219(2); 92-97
36. Ohta K., y otros *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov; 104(5): 1024-30
37. Stampfli, M. R., R. E. Wiley, y otros (1998). *J Clin Invest* 102(9): 1704-14.
38. Cates, E. C., B. U. Gajewska, y otros (2003). *J Allergy Clin Immunol* 111 (5) : 1076-86.
39. CAMPBELL, I.K., y otros (1997) *Annal Res Dis*, 56, 364-368.
- 50 40. BISCHOF, R.J., D. ZAFIROPOULOS, J.A. HAMILTON AND I.K. CAMPBELL (2000) *Clin Exp Immunol*, 119, 361-367.
41. Campbell, I. K., M. J. Rich, y otros (1998). *J Immunol* 161(7): 3639-44.
42. Hamilton, J. A. (2002). *Trends Immunol* 23(8): 403-8.
43. YANG, Y.H. AND J.A. HAMILTON (2001) *Arthritis Rheumatol*, 44, 111-119
- 55 44. Cook, A. D., E. L. Braine, y otros (2001). *Arthritis Res* 3 (5) : 293-8.

45. Field, M. y L. Clinton (1993). *The Lancet* 342: 1244.
46. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. 1990 *J. Immunol*, mayo 1; 144(9): 3347-53
47. Leizer T, y otros 1990 *Blood* 1990 Nov. 15; 76(10): 1989-96
- 5 48. Fiehn C, y otros, *Z Rheumatol* 1992 May-Jun; 51 (3): 1221-126
49. de Vries, E.G., y otros (1991) *Lancet*, 338, 517-518.
50. Hazenberg BP, y otros, *Blood* 1989 Dic.; 74(8): 2769-70
51. Barnes y Hansel (2004). *Lancet*, 364:985-96.
52. Barnes, P.J. (2000). *Chest*, 117:10S-14S
- 10 53. McManus, T. E., y otros (2005) American Thoracic Society Meeting, May 2005.
54. Vlahos, R., y otros (2005). "GM-CSF is a key pathogenic mediator in experimental COPD." European Respiratory Society Meeting, Sept. 2005
55. McQualter JL, y otros, (2001) *J Exp Med*. 194: 873-82
56. Bagby GC Jr, y otros, 1998 *J. Clin Invest*. 4: 1430-6.
57. Estrov Z, y otros, (1986) *Cancer Res*. 46: 6456-61.
- 15 58. Barak Y, y otros, 1981 *Am J Hematol*. 10: 269-75.
59. Gualtieri RJ, y otros, 1988 *Exp Hematol*. 16:613-9.
60. Suda T, y otros, 1982 *Leuk Res*. 6: 43-53.
61. Gualtieri RJ, y otros, 1989 *Blood*. 74: 2360-7
- 20 62. Largaespada DA, y otros, (1996) *Nat. Genet*. 12: 137-43
63. Iversen, P. O., y otros, (1997). *Blood* 90(12): 4910-7.
64. Wang y otros, 1994 *Exp mol Pathol*
65. Plenz y otros, *Art. Thrombosis and Vascular biology* 1997
66. Takashi y otros, 1996 *Circulation* 93, 1185-1193
67. Biwa T y otros, *JBC* 1998 273: 28305-28313
- 25 68. Makheja y otros, *Atherosclerosis* 1989, 76 155-661
69. Naito y otros, 1992 *J Nutri sci Vitamin* 38: 255-264
70. Hayashi y otros, *Atherosclerosis* 1991 91: 107-116
71. Villa y otros, 1994 *J Clin Invest* 93: 1243
72. Van Put DJ y otros, 1995 *Eur J Pharmacol* 294: 753-761
- 30 73. Voisard y otros, 1994 *Int J Cardiol* 43: 257-267
74. Yamada y otros, 1993: *Artery* 20: 253-267
75. Sakai y otros, 1999 *Arterioscler Thromb vasc biol* 19: 1726-1733
76. Gearing, y otros *EMBO J*. 8 (12): 3667-3676 (1989)
77. Crosier, K. y otros *PNAS* 88:7744-7748 1991
- 35 78. ravines, M. y otros *PNAS* 88:8203-8207 1991
79. Wess, L. En: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7, 2004
80. Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
81. Koide y otros, (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
82. Nygren y otros, (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469
- 40 83. Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
84. Mendez, M. y otros, (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156
85. Knappik y otros *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86
86. Krebs y otros, *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67-84
87. Ward, E.S. y otros, *Nature* 341, 544-546 (1989)
- 45 88. McCafferty y otros (1990) *Nature*, 348, 552-554
89. Holt y otros (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
90. Bird y otros, *Science*, 242, 423-426, 1988;
91. Huston y otros, *PNAS Estados Unidos*, 85, 5879-5883, 1988
92. Holliger, P. y otros, *Proc. Natl Acad Sci., Estados Unidos* 90 6444-6448, 1993
- 50 93. Reiter, Y. y otros, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996
94. Hu, S. y otros, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996.
95. Holliger, P. y Winter G. *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449 1993
96. Ridgeway, J. B. B. y otros, *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996
97. *Ann N Y Acad Sci*. 1971 Dic. 31;190:382-93.
- 55 98. Kabat, E.A. y otros, *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*. 4ta Edición. US Department of Health and Human Services. 1987
99. Kabat, E.A. y otros, (1991) *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*, 5ta Edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.

100. Persic y otros, 1997 Gene 187; 9-18
 101. Hanes J y otros, (2000) Methods in Enzymology, Vol 328:24.
 102. Vaughan TJ y otros, (1996) Nature Biotechnology Vol 14:309
 103. Sloopstra-JW; Puijk-WC; Ligtoet-GJ; Langeveld-JP; Meloen-RH (1996). Mol-Divers. 1: 87-96
 104. W001/66754 Cambridge Antibody Technology Limited; Vaughan; Wilton; Smith; Main
 105. P.K. Smith, y otros, Anal. Biochem 150 (1985), págs. 76-85
 106. S. Mizushima y S. Nagata Nucleic Acids Research, Vol 18; No 17 1990 págs. 5322
 107. Clin Haematol. 1979 Jun.; 8(2):263-85. Metcalf D.
 108. Nishijima, I., T. Nakahata, y otros (1997). Blood 90(3): 1031-8.

10 <110> CAMBRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY LTD and ZENYTH OPERATIONS PTY LTD Cohen, Emma
 Suzanne Minter, Ralph Raymond Harrison, Paula Rosamund Sleeman, Matthew Alexander Nash, Andrew Donald
 Fabri, Louis Jerry
 15 <120> MIEMBRO DE UNIÓN PARA EL RECEPTOR GM-CSF
 <130> HMK/CP6442578; 057
 <150> US 60/786569
 <151> 2006-03-27
 <160> 258
 <170> Cambridge Antibody Technology patent software version 1.0
 20 <210> 1
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab1
 25 <400>1

 cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaag tttccggata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct 120
 cccggaaaag gacttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacggcctac 240
 atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gcatcgcccta tcgcccctgg ggccaagggga caatggtcac cgtctcctca 360

 <210>2
 <211>120
 30 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <223> Ab1
 <400>2

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 35 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 395 839 T3

	35		40		45														
	Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Glu	Ile	Val	Tyr	Ala	Gln	Arg	Phe			
		50					55					60							
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr			
	65					70					75					80			
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
					85					90					95				
	Ala	Ile	Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Ile	Ala	Tyr	Arg	Pro	Trp	Gly	Gln			
				100					105						110				
	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115					120											

5	<210>3
	<211>5
	<212>PRT
	<213>Homo sapiens
	<223> Ab1
	<400>3
10	Glu Leu Ser Ile His 5
	<210>4
	<211>17
	<212>PRT
	<213>Homo sapiens
15	<223>Ab1
	<400>4

	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Glu	Ile	Val	Tyr	Ala	Gln	Arg	Phe	Gln
					5					10					15	

	Gly
--	-----

20	<210>5
	<211>11
	<212>PRT
	<213>Homo sapiens
	<223>Ab1
25	<400>5

	Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Ile	Ala	Tyr	Arg	Pro
					5					10	

30	<210>6
	<211>339
	<212>ADN
	<213>Homo sapiens
	<223> Ab1
	<400>6

ES 2 395 839 T3

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctgggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tctgtacttg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcagc 300
attttcggcg gagggaccaa gctcaccgtc ctaggtgcg

5
<210>7
<211>113
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<223> Ab1
<400> 7

10
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
Ser Ile Ser Thr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

15
Ala
<210>8
<211>14
<212>PRT
<213>Homo sapiens
20
<223> Ab1
<400> 8

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

25
<210>9
<211>7
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<223> Ab1
<400>9

ES 2 395 839 T3

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab1
 <400> 10

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Ile Ser Thr Ile
 10
 5 10
 <210> 11
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 11

15
 caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
 20
 tctttcagtg gccccgcctt ggcgccctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcagat 360

<210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 12

25
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 395 839 T3

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 13

5

Glu Leu Ser Ile His
5

10

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 14

15

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

Gly

20

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 15

25

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro
5 10

30

<210> 16
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 16

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctctgtaactg ggagcgggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tateataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

35

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcc

40

<210> 17
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 17

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

5
 <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 18

10 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

15
 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 19

20 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

25
 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 20

30 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 21
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab3
 <400> 21

cagggtcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcattgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgctt attattgttc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 22
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab3
 <400> 22

5

10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

20

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab3
 <400> 23

Glu Leu Ser Ile His
 5

25

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab3

ES 2 395 839 T3

<400> 24

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 . 5 10 15

Gly

5 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab3
 10 <400> 25

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 5 10

15 <210> 26
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab3
 20 <400> 26

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgctc caagtctggc acctcagcct ccttggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgct ctaggtgcg

25 <210> 27
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab3
 <400> 27

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110

Ala

5

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab3
<400> 28

10

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

15

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab3
<400> 29

20

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

25

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab3
<400> 30

30

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
5 10

35

<210> 31
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab4

<400> 31

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa ttccoggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtc ccccaccta cgggtactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

5

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Ab4

<400> 32

10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Ab4

<400> 33

20

Glu Leu Ser Ile His
 5

25

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Ab4

<400> 34

30

ES 2 395 839 T3

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15 -

Gly

5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab4
<400> 35

10

Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr
5 10

15

<210> 36
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab4
<400> 36

caggctgtgc tgactcagcc gtccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttcaggaa cagccccc aa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtccctatg acagcagcct gagggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcacgcgc ctaggtgcg

20

<210> 37
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab4
<400> 37

25

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab4
 <400> 38

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab4
 <400> 39

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab4
 <400> 40

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 41
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 41

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gctaccctta cgcgccgtgg ggccaagga caatggtcac cgtctcaggt 360

5

<210> 42
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 42

10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 43

20

Glu Leu Ser Ile His
 5

25

<210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 44

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

5
 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 45

10 Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro
 5 10

15
 <210> 46
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 46

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctagggtcg

20
 25
 <210> 47
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 47

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

ES 2 395 839 T3

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

5 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 48

10 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

15 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 49

20 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

25 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab5
 <400> 50

30 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

35 <210> 51
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6
 <400> 51

cagggtccagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaag ttccggata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct 120
 cccggaaaag gacttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacggcctac 240
 atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtc ccttgacctt gggcctctgg ggccaagga caatggtcac cgtctcctca 360

40 <210> 52
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6

ES 2 395 839 T3

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab6
<400> 53

10

Glu Leu Ser Ile His
5

15

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab6
<400> 54

20

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

25

Gly
<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab6
<400> 55

30

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
5 10

<210> 56
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab6
<400> 56

```
cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcttgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccttggccat cactgggctc      240
caggetgagg atgaggctga ttattactgc gcgaccgttg aggccggcct gagtggttcg      300
gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtgcg
```

5
 <210> 57
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6
 <400> 57

10

```
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                      10                    15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                    25                    30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                    40                    45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                    55                    60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                    70                    75                    80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
      85                    90                    95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100                   105                   110
Ala
```

15
 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6
 <400> 58

20

```
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                      10
```

25
 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6
 <400> 59

ES 2 395 839 T3

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 <210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6
 <400> 10
 Ala Thr Val Glu Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val
 5 10
 <210> 61
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 61
 caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggcogttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtg gccccgtgta cggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 62
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 62
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu

ES 2 395 839 T3

```

                20                25                30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                40                45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                55                60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
      65                70                75                80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu Trp Gly Lys
      100               105               110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                120

```

5 <210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 63

10 Glu Leu Ser Ile His
 5

15 <210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 64

```

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                10                15

```

20 Gly

25 <210> 65
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 65

```

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu
      5                10

```

30 <210> 66
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 66

ES 2 395 839 T3

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

5

<210> 67
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 67

10

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Ala

15

<210> 68
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 68

20

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

25

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 69

ES 2 395 839 T3

```

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

5  <210> 70
   <211> 11
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab7
   <400> 70

10 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
     .           5           10

15 <210> 71
   <211> 360
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab8
   <400> 71

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact      120
cccacaaaag gat ttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac      180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac      240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg      300
20 tctttcagtc ccccgcccta ccgcccctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt      360

25 <210> 72
   <211> 120
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab8
   <400> 72

```

ES 2 395 839 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5
 10
 15
 20
 25
 30

<210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab8
 <400> 73
 Glu Leu Ser Ile His
 5
 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab8
 <400> 74
 Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15
 Gly
 <210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab8
 <400> 75
 Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro
 5 10
 <210> 76
 <211> 339
 <212> ADN

ES 2 395 839 T3

<213> Homo sapiens
 <223> Ab8
 <400> 76

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcacctatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 5 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctagggtg

<210> 77
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab8
 <400> 77

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

<210> 78
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab8
 <400> 78

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab8

ES 2 395 839 T3

<400> 79

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

5 <210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <223> Ab8
<400> 80

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
5 10

15 <210> 81
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab9
20 <400> 81

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccggtt	attattgtgc	aatagtgggg	300
tctttcagtc	cggtcacgta	cggcctctgg	ggccaaggga	caatggtcac	cgtctcgagt	360

25 <210> 82
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab9
<400> 82

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

30

ES 2 395 839 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 83
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab9
 <400> 83

10

Glu Leu Ser Ile His
 5

15

<210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab9
 <400> 84

20

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

25

<210> 85
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab9
 <400> 85

30

Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
 5 10

35

<210> 86
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab9
 <400> 86

ES 2 395 839 T3

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggtcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

<210> 87
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab9
<400> 87

5

10

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105 110
Ala

15

20

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab9
<400> 88

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
5 10

25

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab9
<400> 89

ES 2 395 839 T3

```

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

5  <210> 90
   <211> 11
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab9
   <400> 90

10  Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5              10

15  <210> 91
   <211> 360
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab10
   <400> 91

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact      120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac      180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac      240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg      300
20  tctttcagtg gcctgcgta caggccctgg ggcaaagga caatggtcac catctcgagt      360

25  <210> 92
   <211> 120
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab10
   <400> 92

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
20 25 30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Ile Ser Ser
115 120

5
<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab10
<400> 93

10
Glu Leu Ser Ile His
5

15
<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab10
<400> 94

20
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

25
Gly
<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab10
<400> 95

30
Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro
5 10

<210> 96
<211> 339
<212> ADN

ES 2 395 839 T3

<213> Homo sapiens
 <223> Ab10
 <400> 96

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 5 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcacctgc ctaggtgcg

<210> 97
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab10
 <400> 97

10
 15
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

<210> 98
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab10
 <400> 98

20
 25
 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 99
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 395 839 T3

<213> Homo sapiens
 <223> Ab10
 <400> 99

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

<210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab10
 <400> 100

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 101
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab11
 <400> 101

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggcgctgag gtgaagaagc ctgaggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa ttccgggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtc cgatcacgta cggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 102
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab11
 <400> 102

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

ES 2 395 839 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Pro Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 103
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab11
 <400> 103

10

Glu Leu Ser Ile His
 5

15

<210> 104
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab11
 <400> 104

20

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

25

Gly
 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab11
 <400> 105

30

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu
 5 10

35

<210> 106
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab11

ES 2 395 839 T3

```

<400> 106
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctccaggggtc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgagggtga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg      300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

<210> 107
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab11
<400> 107

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Pro Gly Gln
           5                        10                15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
           20                        25                30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
           35                        40                45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
           50                        55                60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
           65                        70                75                80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
           85                        90                95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
           100                       105                110

Ala

<210> 108
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab11
<400> 108

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
           5                        10

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab11
<400> 109
    
```

ES 2 395 839 T3

```

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
      5

5  <210> 110
   <211> 11
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab11
   <400> 110

10  Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
      5                               10

15  <210> 111
   <211> 360
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab12
   <400> 111

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact      120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac      180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac      240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg      300
20  tctttcagtg gctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt      360

25  <210> 112
   <211> 120
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <223> Ab12
   <400> 112

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 113
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 113

5

Glu Leu Ser Ile His
 5

10

<210> 114
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 114

15

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

20

Gly

<210> 115
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 115

25

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 5 10

30

<210> 116
 <211> 339
 <212> ADN

ES 2 395 839 T3

<213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 116

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgctc caagtctggc acctcagcct ccttgccat cactgggctc 240
 5 caggctgacg atgaggetga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300
 cgcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc ctaggtgcg

<210> 117
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 117

15 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
 85 90 95
 Pro Thr Glu Ile Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Ala

<210> 118
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 118

25 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 119
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 395 839 T3

```

<213> Homo sapiens
<223> Ab12
<400> 119

  His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5      5

<210> 120
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
    <223> Ab12
    <400> 120

  Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
15      5          10

<210> 121
<211> 360
<212> ADN
20 <213> Homo sapiens
    <223> Ab13
    <400> 121

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact      120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac      180
gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac      240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg      300
tctttcagtg gctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt      360

25 <210> 122
    <211> 120
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <223> Ab13
30 <400> 122

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

```

ES 2 395 839 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab13
 <400> 123

10

Glu Leu Ser Ile His
 5

15

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab13
 <400> 124

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

20

Gly

25

<210> 125
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab13
 <400> 125

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 5 10

30

<210> 126
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab13
 <400> 126

35

ES 2 395 839 T3

<210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab13
 <400> 130

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Thr Gly Ile Ile Val
 5
 10
 5 10

<210> 131
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 131

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa ttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatattgggg 300
 agcgtgaccg cctgggcctt tgactactgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 132
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 132

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 395 839 T3

5 <210> 133
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 133

 Glu Leu Ser Ile His
 5
 10
 <210> 134
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 134

 Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

 Gly
 20
 <210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 135
 25

 Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr
 5 10
 30
 <210> 136
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 136
 35

 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tadcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tetetgcctc caagtctggc acctcagcct cectggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagga caggatgacg 300
 gagttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctagggtgcg
 40
 <210> 137
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 137
 45

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
 85 90 95
 Asp Arg Met Thr Glu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

5
 <210> 138
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 138

10
 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

15
 <210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 139

20
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

25
 <210> 140
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab14
 <400> 140

30
 Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Asp Arg Met Thr Glu
 5 10

35
 <210> 141
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 141

ES 2 395 839 T3

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcattgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccggtt attattgttc aatagccggg 300
 agcatccccg gctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcagat 360

5
 <210> 142
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 142

10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15
 <210> 143
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 143

Glu Leu Ser Ile His
 5

25
 <210> 144
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 144

ES 2 395 839 T3

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

Gly

5 <210> 145
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 145

10 Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 5 10

15 <210> 146
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 146

20 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtt gattagcgcc 300

25 gccttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

<210> 147
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 147

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95

Leu Ile Ser Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Ala

5

<210> 148
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 148

10

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

15

<210> 149
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 149

20

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

25

<210> 150
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 150

30

Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Leu Ile Ser Ala Ala
 5 10

35

<210> 151
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 151

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
 tctttcagtc cgttgaccat gggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

40

<210> 152
 <211> 120

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Abl6
 <400> 152

5

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
      20                      25                      30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
      35                      40                      45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
      50                      55                      60

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

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

Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu Trp Gly Lys
      100                     105                     110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                      120
    
```

<210> 153
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 153

10

Glu Leu Ser Ile His
 5

15

<210> 154
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 154

20

```

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
      5                      10                      15
    
```

25

Gly

<210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 155

30

```

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu
      5                      10
    
```

<210> 156
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 156

5

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc ggcacctcgc acgagatcct gagtggttcg 300

10

gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

<210> 157
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 157

15

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Asp Glu Ile
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

20

Ala

<210> 158
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 158

25

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

30

<210> 159
 <211> 7

ES 2 395 839 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 159
 5
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5

 <210> 160
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 160
 10
 Ala Thr Ser Asp Glu Ile Leu Ser Gly Ser Val
 15 5 10

 <210> 161
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 161
 20

 cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa ttccgggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
 tctttcagtc ccctgacgat ggggttgtgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360
 25

 <210> 162
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 162
 30

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 35

ES 2 395 839 T3

5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 163
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 163

10

Glu Leu Ser Ile His
5

15

<210> 164
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 164

20

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

25

Gly
 <210> 165
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 165

30

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu
5 10

35

<210> 166
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 166

ES 2 395 839 T3

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccttggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtcg aggacggcct gagtggttcg 300
 gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

5

<210> 167
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 167

10

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Asp Gly
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Ala

15

<210> 168
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 168

20

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

25

<210> 169
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 169

ES 2 395 839 T3

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 <210> 170
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 170

Ala Thr Val Glu Asp Gly Leu Ser Gly Ser Val
 10
 5 10
 <210> 171
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab18
 <400> 171

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgttca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
 gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
 ctgaccctga gcagcctgag atccgaagac acggcogttt attattgttc aacagtgggg 300
 tctttcagtg ggcccgccct tcacctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcagat 360

<210> 172
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab18
 <400> 172

ES 2 395 839 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
20 25 30

Phe Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

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

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

Ser Thr Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu Trp Gly Lys
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 173
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab18
<400> 173

5

Glu Leu Phe Ile His
5

10

<210> 174
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab18
<400> 174

15

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15

20

Gly

<210> 175
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab18
<400> 175

25

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu
5 10

30

<210> 176
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab18

ES 2 395 839 T3

<400> 176

```

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tctctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttcaggaa cagcccccaa actcctcatc tateataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtg gaaccagccc      300
ctcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg

```

5

<210> 177

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Ab18

<400> 177

10

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5                               10                          15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20                               25                          30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                               40                          45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                               55                          60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                               70                          75                          80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
      85                               90                          95
Trp Asn Gln Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
      100                              105                          110

```

15

Ala

<210> 178

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Ab18

<400> 178

20

```

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
      5                               10

```

25

<210> 179

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Ab18

<400> 179

30

ES 2 395 839 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
20 25 30
Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ile Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 183
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab19
<400> 183

10

Glu Leu Ser Ile His
5

15

<210> 184
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab19
<400> 184

20

Gly

<210> 185
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab19
<400> 185

25

Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe
5 10

30

<210> 186
<211> 339
<212> ADN

ES 2 395 839 T3

<213> Homo sapiens
 <223> Ab19
 <400> 186

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctctgactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccggaa cccccacgtc 300
 atcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc ctaagtgcg

5

<210> 187
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab19
 <400> 187

10

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Arg
 85 90 95
 Asn Pro His Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
 100 105 110

15

Ala

<210> 188
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab19
 <400> 188

20

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

25

<210> 189
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab19

30

ES 2 395 839 T3

<400> 189

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

5

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab19
<400> 190

10

Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Asn Pro His Val Ile
5 10

15

<210> 191
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab20
<400> 191

20

caggtgcagc	tggtgcaatc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcatgtaaaa	tttccggaca	cagcctcagt	gaactgtcca	tccactgggt	gcgacagact	120
cccacaaaag	gatttgagtg	gatgggagga	tttgatcctg	aagagaatga	aatagtctac	180
gcacagaggt	tccagggcag	agtcaccatg	accgaggaca	catctataga	cacggcctac	240
ctgaccctga	gcagcctgag	atccgacgac	acggccgttt	attattgttc	aatagtgggg	300
tctttcagtc	ccctgacgct	gggcctctgg	ggcaaagggg	caatggtcac	cgtctcgagt	360

25

<210> 192
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab20
<400> 192

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly His Ser Leu Ser Glu Leu
 20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Thr Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

<210> 193
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab20
 <400> 193

10

Glu Leu Ser Ile His
 5

15

<210> 194
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab20
 <400> 194

20

Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

25

Gly
 <210> 195
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab20
 <400> 195

30

Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
 5 10

<210> 196
 <211> 339
 <212> ADN

ES 2 395 839 T3

<213> Homo sapiens
 <223> Ab20
 <400> 196

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tectgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 5 cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc gcgaccgtgg acgaggccct gagtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaagtgcg

<210> 197
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab20
 <400> 197

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Asp Glu Ala
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser
 100 105 110
 Ala

<210> 198
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab20
 <400> 198

Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

<210> 199
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab20

<400> 199

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

5

<210> 200
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab20
<400> 200

10

Ala Thr Val Asp Glu Ala Leu Ser Gly Ser Val
5 10

15

<210> 201
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 201

20

Tyr Leu Asp Phe Gln
5

25

<210> 202
<211> 385
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 202

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro
20 25 30

Ala Ser Ser Leu Asn Val Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser
35 40 45

Trp Asp Cys Gln Glu Asn Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp

ES 2 395 839 T3

50 55 60
 Lys Lys Asn Arg Val Val Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser
 65 70 75 80
 Cys Thr Phe Arg Glu Ile Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val
 85 90 95
 His Val Asn Thr Ser Gln Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro
 100 105 110
 Asn Ser Gly Arg Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile
 115 120 125
 Tyr Asn Ala Asp Leu Met Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala
 130 135 140
 Pro Arg Asp Val Gln Tyr Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg
 145 150 155 160
 Arg Glu Ile Arg Cys Pro Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val
 165 170 175
 Gly Cys His Leu Asp Asn Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe
 180 185 190
 Leu Val Asn Gly Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser
 195 200 205
 Leu Leu Asp Thr Lys Lys Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val
 210 215 220
 Thr Val Arg Cys Asn Thr Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro
 225 230 235 240
 Arg Thr Tyr Gln Lys Leu Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp
 245 250 255
 Val His Arg Lys Asn Thr Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn
 260 265 270
 Val Ser Gly Asp Leu Glu Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro
 275 280 285
 Arg Ala Lys His Ser Val Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu
 290 295 300
 Asn Trp Ser Ser Trp Ser Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
 305 310 315 320
 Asn Leu Gly Ser Val Tyr Ile Tyr Val Leu Leu Ile Val Gly Thr Leu
 325 330 335
 Val Cys Gly Ile Val Leu Gly Phe Leu Phe Lys Arg Phe Leu Arg Ile
 340 345 350
 Gln Arg Leu Phe Pro Pro Val Pro Gln Ile Lys Asp Lys Leu Asn Asp
 355 360 365
 Asn His Glu Val Glu Asp Glu Ile Ile Trp Glu Glu Phe Thr Pro Glu
 370 375 380
 Glu
 385

5

<210> 203
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220> Secuencia humana con etiqueta FLAG
 <400> 203

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

Thr Ser Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr
 195 200 205
 Lys Lys Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys
 210 215 220
 Asn Thr Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln
 225 230 235 240
 Lys Leu Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys
 245 250 255
 Asn Thr Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn Val Ser Gly Asp
 260 265 270
 Leu Glu Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His
 275 280 285
 Ser Val Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser
 290 295 300
 Trp Ser Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly
 305 310 315
 <210> 204
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220> Péptido sintético
 <223> Péptido FLAG
 <400> 204
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 <210> 205
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 205
 Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu Asn Val
 1 5 10 15
 Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln Glu Asn
 20 25 30
 Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg Val Val

ES 2 395 839 T3

Glu Lys Ser Asp Leu Arg Thr Val Ala Pro Ala Ser Ser Leu Asn Val
 1 5 10 15
 Arg Phe Asp Ser Arg Thr Met Asn Leu Ser Trp Asp Cys Gln Glu Asn
 20 25 30
 Thr Thr Phe Ser Lys Cys Phe Leu Thr Asp Lys Lys Asn Arg Val Val
 35 40 45
 Glu Pro Arg Leu Ser Asn Asn Glu Cys Ser Cys Thr Phe Arg Glu Ile
 50 55 60
 Cys Leu His Glu Gly Val Thr Phe Glu Val His Val Asn Thr Ser Gln
 65 70 75 80
 Arg Gly Phe Gln Gln Lys Leu Leu Tyr Pro Asn Ser Gly Arg Glu Gly
 85 90 95
 Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile Tyr Asn Ala Asp Leu Met
 100 105 110
 Asn Cys Thr Trp Ala Arg Gly Pro Thr Ala Pro Arg Asp Val Gln Tyr
 115 120 125
 Phe Leu Tyr Ile Arg Asn Ser Lys Arg Arg Arg Glu Ile Arg Cys Pro
 130 135 140
 Tyr Tyr Ile Gln Asp Ser Gly Thr His Val Gly Cys His Leu Asp Asn
 145 150 155 160
 Leu Ser Gly Leu Thr Ser Arg Asn Tyr Phe Leu Val Asn Gly Thr Ser
 165 170 175
 Arg Glu Ile Gly Ile Gln Phe Phe Asp Ser Leu Leu Asp Thr Lys Lys
 180 185 190
 Ile Glu Arg Phe Asn Pro Pro Ser Asn Val Thr Val Arg Cys Asn Thr
 195 200 205
 Thr His Cys Leu Val Arg Trp Lys Gln Pro Arg Thr Tyr Gln Lys Leu
 210 215 220
 Ser Tyr Leu Asp Phe Gln Tyr Gln Leu Asp Val His Arg Lys Asn Thr
 225 230 235 240
 Gln Pro Gly Thr Glu Asn Leu Leu Ile Asn Val Ser Gly Asp Leu Glu
 245 250 255
 Asn Arg Tyr Asn Phe Pro Ser Ser Glu Pro Arg Ala Lys His Ser Val
 260 265 270

ES 2 395 839 T3

Lys Ile Arg Ala Ala Asp Val Arg Ile Leu Asn Trp Ser Ser Trp Ser
 275 280 285
 Glu Ala Ile Glu Phe Gly Ser Asp Asp Gly Asn Leu Gly Ser Val Tyr
 290 295 300
 Ile Tyr Val Leu Leu Ile Val Gly Thr Leu Val Cys Gly Ile Val Leu
 305 310 315 320
 Gly Phe Leu Phe Lys Arg Phe Leu Arg Ile Gln Arg Leu Phe Pro Pro
 325 330 335
 Val Pro Gln Ile Lys Asp Lys Leu Asn Asp Asn His Glu Val Glu Asp
 340 345 350
 Glu Ile Ile Trp Glu Glu Phe Thr Pro Glu Glu Gly Lys Gly Tyr Arg
 355 360 365
 Glu Glu Val Leu Thr Val Lys Glu Ile Thr
 370 375

5

<210> 207
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Abl
 <400> 207

10

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcagc 300
 attttcggcg gagggaccaa gctcaccgctc cta

15

<210> 208
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab1
 <400> 208

20

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

ES 2 395 839 T3

				5						10						15			
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Pro				
			20					25					30						
Tyr	Asp	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu				
		35					40					45							
Leu	Ile	Tyr	His	Asn	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe				
	50					55					60								
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu				
65					70					75					80				
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser				
				85					90					95					
Ser	Ile	Ser	Thr	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu					
			100					105					110						

5

<210> 209
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 209

10

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggtc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggggtc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gâgtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15

<210> 210
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab2
 <400> 210

Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

5
 <210> 213
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab4
 <400> 213

10
 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcadc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgacegat tctetgctc caagtctggc acctcagcct ccttggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15
 <210> 214
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab4
 <400> 214

20
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

<210> 217
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6
 <400> 217

5

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctgtacttg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgaccgttg aggccggcct gagtgggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta

10

<210> 218
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab6
 <400> 218

15

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Val Glu Ala Gly
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

20

<210> 219
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab7
 <400> 219

25

ES 2 395 839 T3

```

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tadcataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg      300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcacctgc cta
<210> 220
<211> 111
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab7
<400> 220

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
      5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
      20              25              30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
10 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65              70              75              80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85              90              95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
      100             105             110

15 <210> 221
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> AbB
20 <400> 221

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc      60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag      120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tadcataaca acaagcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc      240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg      300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcacctgc cta

```

ES 2 395 839 T3

<210> 222
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab8
 <400> 222

5

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 . 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

10

<210> 223
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab9
 <400> 223

15

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctctgactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

20

<210> 224
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab9
 <400> 224

25

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

5

<210> 225
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab10
<400> 225

10

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttcaggaa cagcccccaa actcctcadc tadcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctgctc caagtctggc acctcagcct ccttgccat cactgggctc 240
caggetgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15

<210> 226
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab10
<400> 226

20

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Val Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

5

<210> 229
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 229

10

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300
 cgcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc cta

15

<210> 230
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab12
 <400> 230

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
 85 90 95
 Pro Thr Glu Ile Arg Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5

<210> 231
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab13
 <400> 231

10

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacateggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtccatg acagcaggac gggcatcatc 300
 gtcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15

<210> 232
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab13
 <400> 232

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
20 25 30
Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Arg
85 90 95
Thr Gly Ile Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

5

<210> 233
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<223> Ab14
<400> 233

10

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagga caggatgacg 300
gagttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15

<210> 234
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Ab14
<400> 234

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Glu
 85 90 95
 Asp Arg Met Thr Glu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

5

<210> 235
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 235

10

caggctgtgc tgactcagcc gtctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtctatg acagccagtt gattagcggc 300
 gccttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15

<210> 236
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab15
 <400> 236

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Gln
 85 90 95
 Leu Ile Ser Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

5

<210> 237
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 237

10

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgactcg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgacctcgg acgagatcct gagtgggttcg 300
 gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15

<210> 238
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab16
 <400> 238

ES 2 395 839 T3

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro
 20 25 30
 Tyr Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr His Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Ser Asp Glu Ile
 85 90 95
 Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

5

<210> 239
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 239

10

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc taccataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc ggcaccgtcg aggacggcct gagggttcg 300
 gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta

15

<210> 240
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ab17
 <400> 240

5 <210> 254
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ac 6
 <400> 254

10 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 5 10

15 <210> 255
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ac 6
 <400> 255

20 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15

 Arg Val Thr Ile Ser Cys
 20

25 <210> 256
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ac 6
 <400> 256

30 Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 5 10 15

35 <210> 257
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ac 6
 <400> 257

40 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
 5 10 15

 Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

45 <210> 258
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <223> Ac 6
 <400> 258

 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un miembro de unión aislado para el GM-CSFR α humano, en donde miembro de unión comprende una molécula de anticuerpo que inhibe la unión de GM-CSF a GM-CSFR α , y en donde el miembro de unión se une a una secuencia Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln en las posiciones 226 a 230 del GM-CSFR α humano como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 206, y en donde el miembro de unión se une al dominio extracelular de GM-CSFR α con una afinidad (KD) de menos que 4 nM en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.
- 10 2. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 1, que se une a una huella de los residuos que comprende Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln correspondiente a las posiciones 226 a 230 de la sec. con núm. de ident.: 206 como se determinó mediante una exploración de los péptidos de unión.
- 15 3. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco, en donde el conjunto de regiones determinantes de la complementariedad comprende una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 3 o sec. con núm. de ident.: 173, una CDR2 con una secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 5; sec. con núm. de ident.: 15; sec. con núm. de ident.: 35; sec. con núm. de ident.: 45; sec. con núm. de ident.: 55; sec. con núm. de ident.: 65; sec. con núm. de ident.: 75; sec. con núm. de ident.: 85; sec. con núm. de ident.: 95; sec. con núm. de ident.: 105; sec. con núm. de ident.: 115; sec. con núm. de ident.: 125; sec. con núm. de ident.: 135; sec. con núm. de ident.: 145; sec. con núm. de ident.: 155; sec. con núm. de ident.: 165; sec. con núm. de ident.: 175; sec. con núm. de ident.: 185; y sec. con núm. de ident.: 195; o comprende ese conjunto de secuencias CDR con una o dos sustituciones de aminoácido.
- 20 4. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco, y en donde el residuo de Kabat H97 en VH CDR3 es S.
- 25 5. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en donde VH CDR3 comprende además uno o más de los siguientes residuos:
 30 V, N, A o L en el residuo de Kabat H95;
 S, F, H, P, T o W en el residuo de Kabat H99;
 A, T, P, S, V o H en el residuo de Kabat H100B.
- 35 6. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el residuo de Kabat H95 es V.
7. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde residuo de Kabat H99 es S.
- 40 8. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el residuo de Kabat H100B es A o T.
- 45 9. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde VH CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la sec. con núm. de ident.: 5, sec. con núm. de ident.: 15, sec. con núm. de ident.: 35, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 55, sec. con núm. de ident.: 65, sec. con núm. de ident.: 75, sec. con núm. de ident.: 85, sec. con núm. de ident.: 95, sec. con núm. de ident.: 105, sec. con núm. de ident.: 115, sec. con núm. de ident.: 125, sec. con núm. de ident.: 135, sec. con núm. de ident.: 145, sec. con núm. de ident.: 155, sec. con núm. de ident.: 165, sec. con núm. de ident.: 175, sec. con núm. de ident.: 185 y sec. con núm. de ident.: 195.
- 50 10. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde el residuo de Kabat H34 en VH CDR1 es I.
11. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en donde VH CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 3.
- 55 12. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde VH CDR2 comprende E en el residuo de Kabat H54 y/o I en el residuo de Kabat H57.

13. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en donde VH CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 4.
- 5 14. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en donde el residuo de Kabat H17 en el marco de dominio VH es S.
15. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, que comprende un dominio de anticuerpo que comprende regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco.
- 10 16. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 15, en donde VL CDR3 comprende uno o más de los siguientes residuos:
 S, T o M en el residuo de Kabat L90;
 D, E, Q, S, M o T en el residuo de Kabat L92;
 S, P, I o V en el residuo de Kabat L96.
- 15 17. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el residuo de Kabat L90 es S.
18. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 16 o reivindicación 17, en donde el residuo de Kabat L92 es D o E.
- 20 19. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el residuo de Kabat L95A es S.
- 25 20. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde el residuo de Kabat L96 es S.
- 30 21. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en donde VL CDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 20, sec. con núm. de ident.: 40, sec. con núm. de ident.: 50, sec. con núm. de ident.: 60, sec. con núm. de ident.: 70, sec. con núm. de ident.: 80, sec. con núm. de ident.: 90, sec. con núm. de ident.: 100, SEQ ID NO : 110, sec. con núm. de ident.: 120, sec. con núm. de ident.: 130, sec. con núm. de ident.: 140, sec. con núm. de ident.: 150, sec. con núm. de ident.: 160, SEQ ID NO : 170, sec. con núm. de ident.: 180, sec. con núm. de ident.: 190 y sec. con núm. de ident.: 200.
- 35 22. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en donde VL CDR1 comprende uno o más de los siguientes residuos:
 S en el residuo de Kabat 27A;
 N en el residuo de Kabat 27B ;
 I en el residuo de Kabat 27C;
 D en el residuo de Kabat 32.
- 40 23. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, en donde VL CDR1 tiene una secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident. : 8.
- 45 24. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, en donde VL CDR2 comprende uno o más de los siguientes residuos:
 N en el residuo de Kabat 51;
 N en el residuo de Kabat 52;
 K en el residuo de Kabat 53.
- 50 25. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, en donde VL CDR2 tiene una secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 9.
- 55 26. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 25, que comprende un dominio VH de anticuerpo en el cual el residuo de Kabat H94 es I.
27. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, que se une al dominio extra-celular humano de GM-CSFR α con una afinidad (KD) de 1 nM o menos en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.

28. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 27, que se une al dominio extra-celular humano de GM-CSFR α con una afinidad (KD) de 0.5 nM o menos en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.
- 5 29. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una potencia neutralizante IC50 de 60 pM o menos en un ensayo de proliferación de células TF-1 con GM-CSF humano 7 pM.
30. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 29, que tiene una potencia neutralizante IC50 de 10 pM o menos en un ensayo de proliferación de células TF-1 con GM-CSF humano 7 pM.
- 10 31. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una potencia neutralizante IC50 de 50 pM o menos en un ensayo de cambio de forma del granulocito humano con GM-CSF humano 7 pM.
- 15 32. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 31, que tiene una potencia neutralizante IC50 de 25 pM o menos en un en un ensayo de cambio de forma del granulocito humano con GM-CSF humano 7 pM.
33. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una potencia neutralizante IC50 de 100 pM o menos en un ensayo de liberación de monocitos TNF α con GM-CSF humano 1 nM.
- 20 34. Un miembro de unión aislado para GM-CSFR α humano, en donde el miembro de unión comprende una molécula de anticuerpo que comprende un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:
- 25 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 3, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 4, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 5, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 8, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 9 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 10;
- HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 13, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 14, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 15, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 18, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 19 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 20;
- 30 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 33, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 34, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 35, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 38, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 39 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 40;
- HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 43, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 44, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 45, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 48, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 49 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 50;
- 35 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 53, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 54, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 55, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 58, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 59 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 60;
- 40 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 63, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 64, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 65, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 68, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 69 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 70;
- HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 73, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 74, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 75, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 78, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 79 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 80;
- 45 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 83, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 84, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 85, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 88, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 89 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 90;

HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 93, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 94, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 95, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 98, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 99 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 100;

5 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 103, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 104, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 105, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 108, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 109 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 110 ;

HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 113, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 114, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 115, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 118, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 119 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 120;

10 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 123, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 124, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 125, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 128, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 129 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 130;

15 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 133, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 134, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 135, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 138, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 139 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 140;

HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 143, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 144, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 145, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 148, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 149 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 150;

20 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 153, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 154, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 155, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 158, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 159 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 160;

HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 163, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 164, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 165, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 168, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 169 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 170;

25 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 173, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 174, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 175, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 178, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 179 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 180;

30 HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 183, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 184, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 185, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 188, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 189 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 190; or

HCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 193, HCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 194, HCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 195, LCDR1 es la sec. con núm. de ident.: 198, LCDR2 es la sec. con núm. de ident.: 199 y LCDR3 es la sec. con núm. de ident.: 200.

35 **35.** Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 34, en donde:

40 HCDR1 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 53;
HCDR2 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 54;
HCDR3 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 55;
LCDR1 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 58;
LCDR2 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 59; y
LCDR3 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 60.

36. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el miembro de unión es una molécula de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácido del dominio VH de anticuerpo sec. con núm. de ident.: 52 y una secuencia de aminoácido del dominio VL sec. con núm. de ident.: 57.
- 5 37. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, en donde la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo humana o humanizada.
38. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el marco de dominio VH es un marco de la línea germinal humana VH1 DP5 o VH3 DP47 .
- 10 39. Un miembro de unión de acuerdo con la reivindicación 37 o reivindicación 38, que comprende un dominio VL en donde el marco de dominio VL 3 es un marco de la línea germinal humana VLambda 1 DPL8, VLambda 1 DPL3 o VLambda 6_6a .
- 15 40. Una molécula de anticuerpo aislada para GM-CSFR α humano, que inhibe la unión de GM-CSF a GM-CSFR α , en donde el miembro de unión se une al dominio extracelular de GM-CSFR α humano con una afinidad (K_D) de menos que 1 nM en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, y en donde el miembro de unión comprende un dominio VH con la secuencia de aminoácidos del dominio VH mostrada en la sec. con núm. de ident.: 52 o una variante de la misma con una o dos alteraciones de aminoácidos, y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos del dominio VL mostrada en la sec. con núm. de ident.: 57 o una variante de la misma con una o dos alteraciones de aminoácidos; en donde las alteraciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste de sustituciones, inserciones y deleciones.
- 20 41. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 40, en donde la secuencia de aminoácidos del dominio VH es la sec. con núm. de ident.: 52 y la secuencia de aminoácidos del dominio VL es la sec. con núm. de ident.: 218.
- 25 42. Un miembro de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, o una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 40 o reivindicación 41, en donde la molécula de anticuerpo es IgG4.
- 30 43. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un miembro de unión o molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39.
44. Una célula hospedera *in vitro* que contiene una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 43.
- 35 45. Un método para producir un miembro de unión o molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, que comprende cultivar células huésped de acuerdo con la reivindicación 44.
46. Un método de acuerdo con la reivindicación 45, que además comprende purificar el miembro de unión.
- 40 47. Uso de un miembro de unión o molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o leucemia mieloide.
- 45 48. Un miembro de unión o molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41 para usar en el tratamiento de artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o leucemia mieloide.

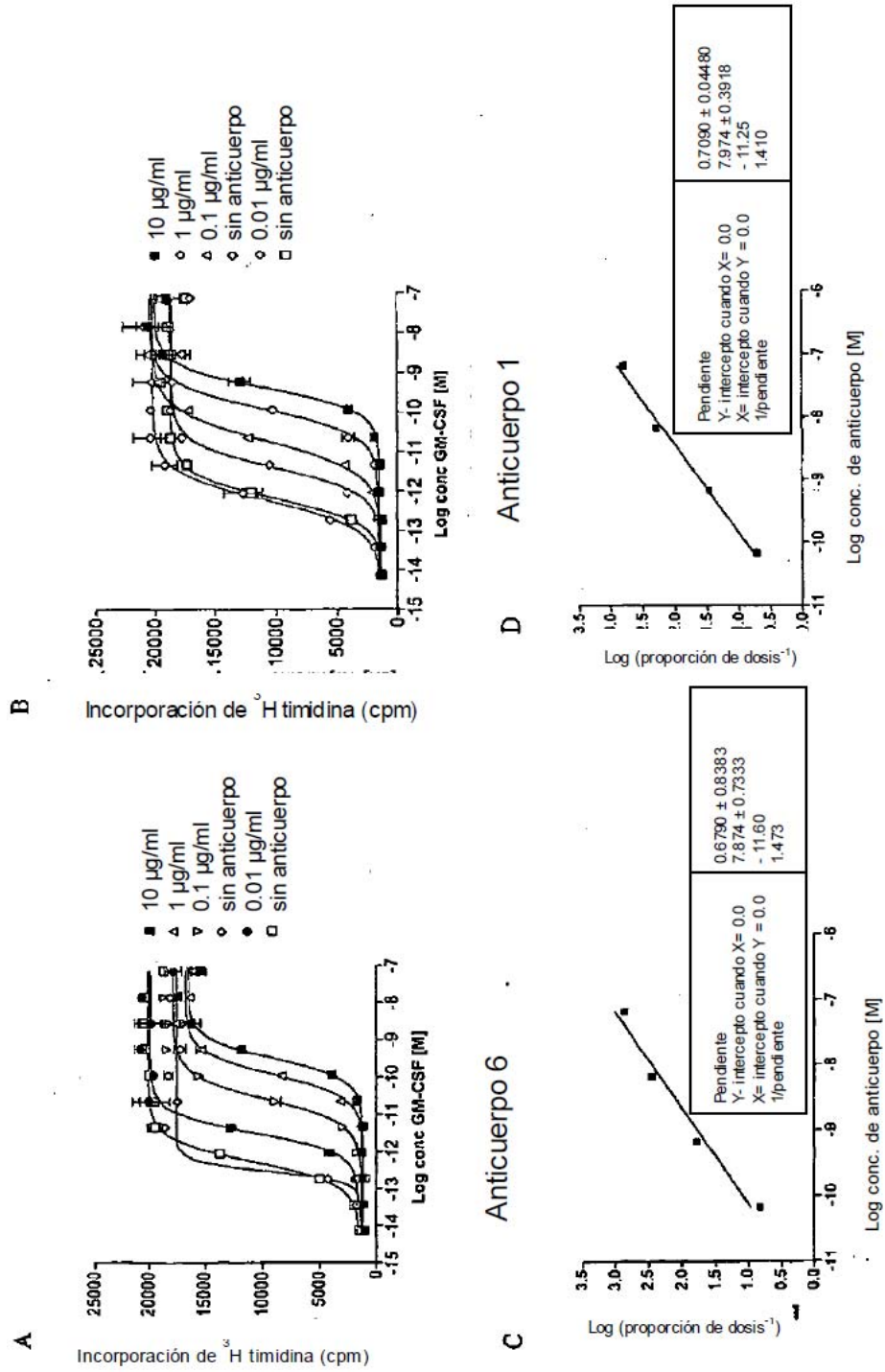


Figura 1

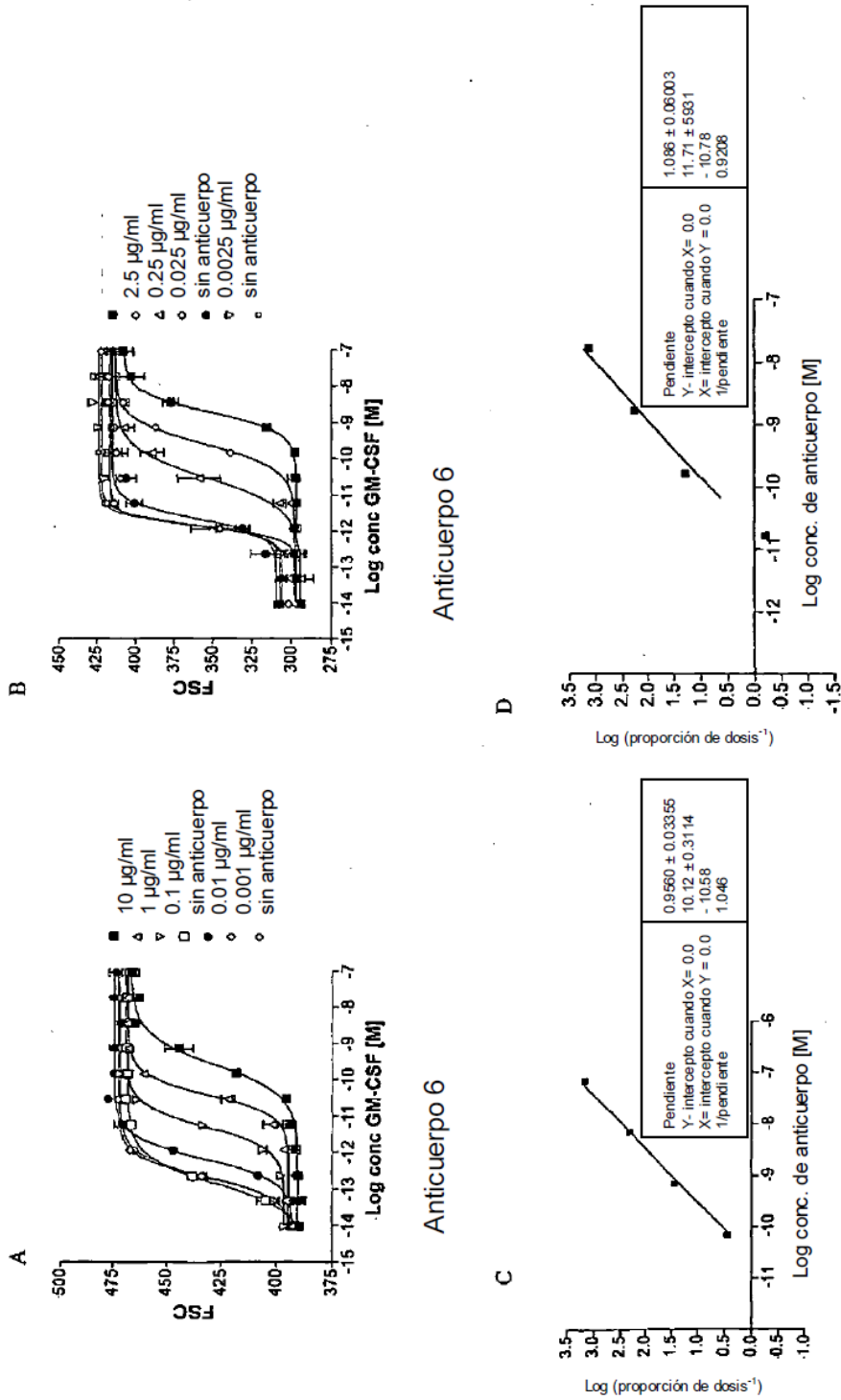


Figura 2

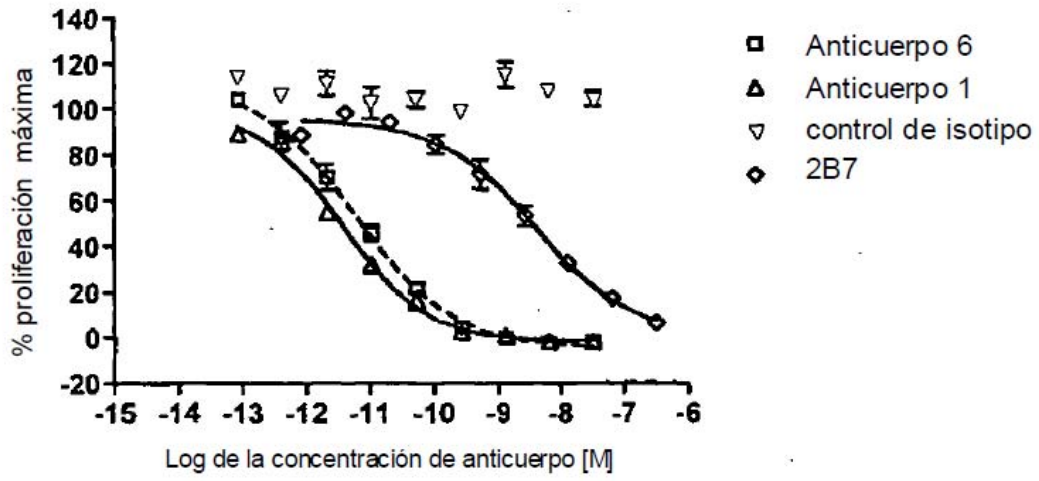


Figura 3

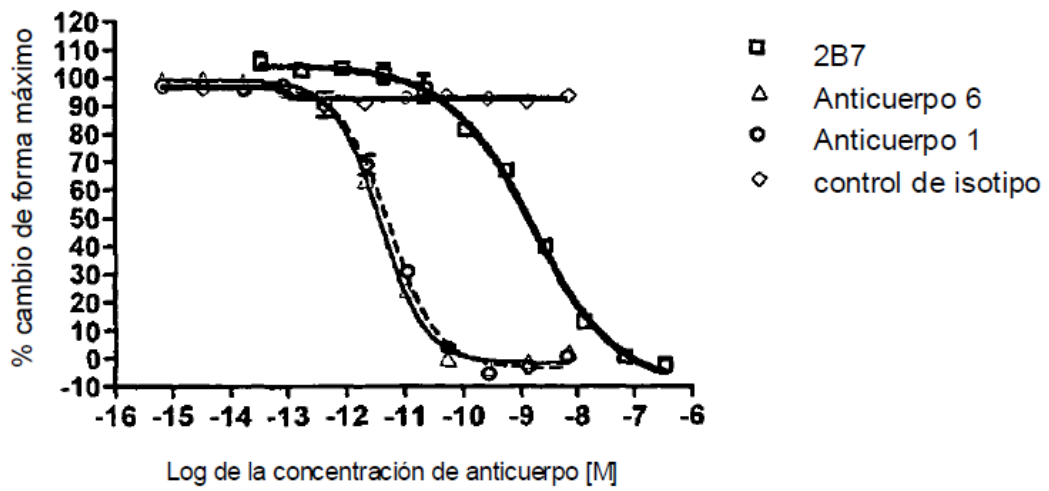


Figura 4

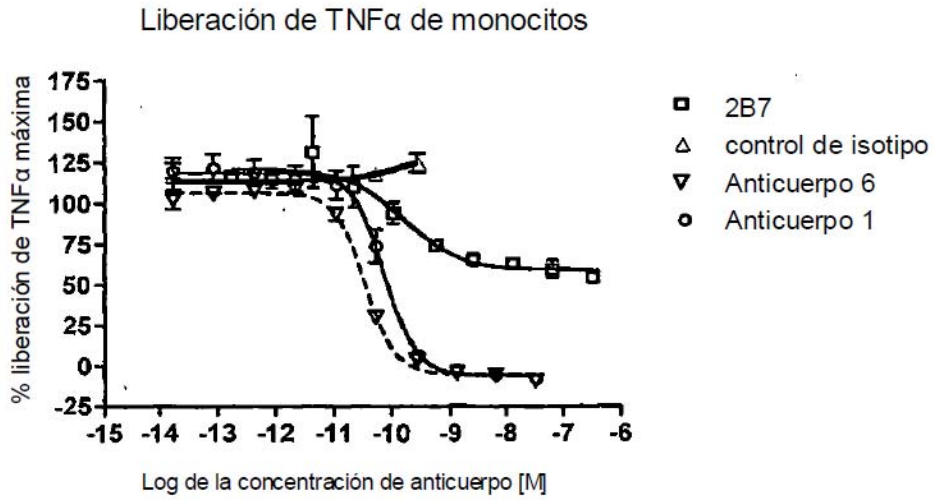


Figura 5

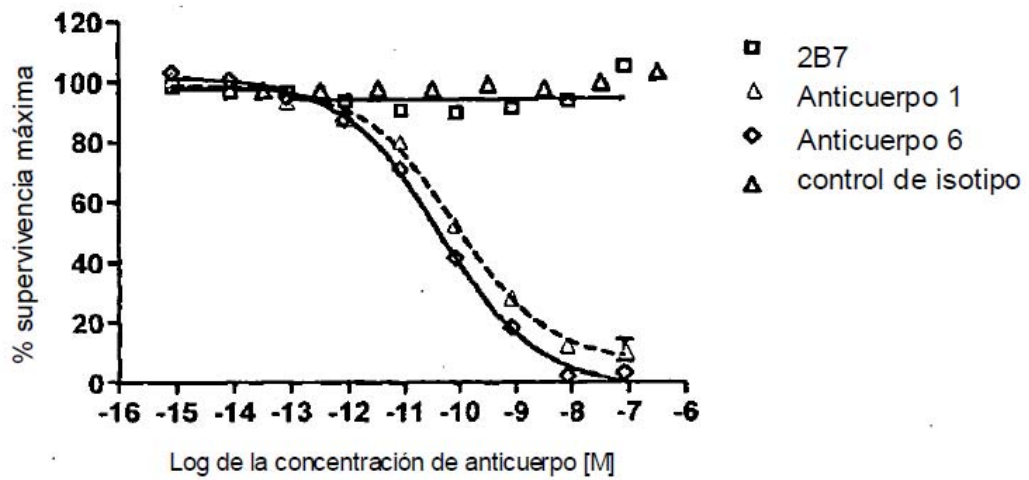


Figura 6

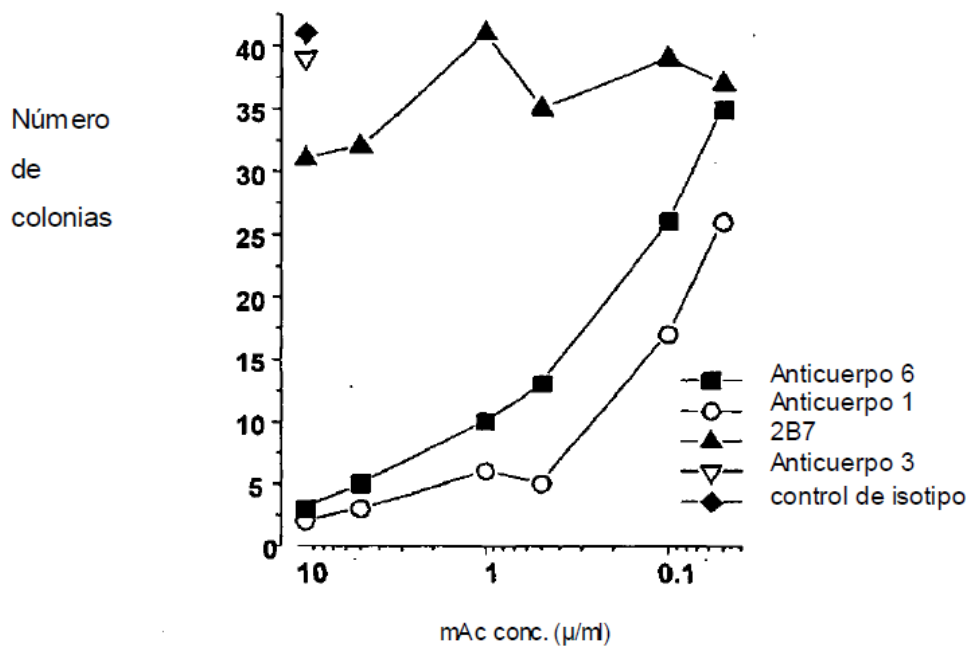


Figura 7

Peso del bazo como el % del peso corporal
 2 x 500 ng de hGMCSF, titulación del mAc de prueba (1 inyección)

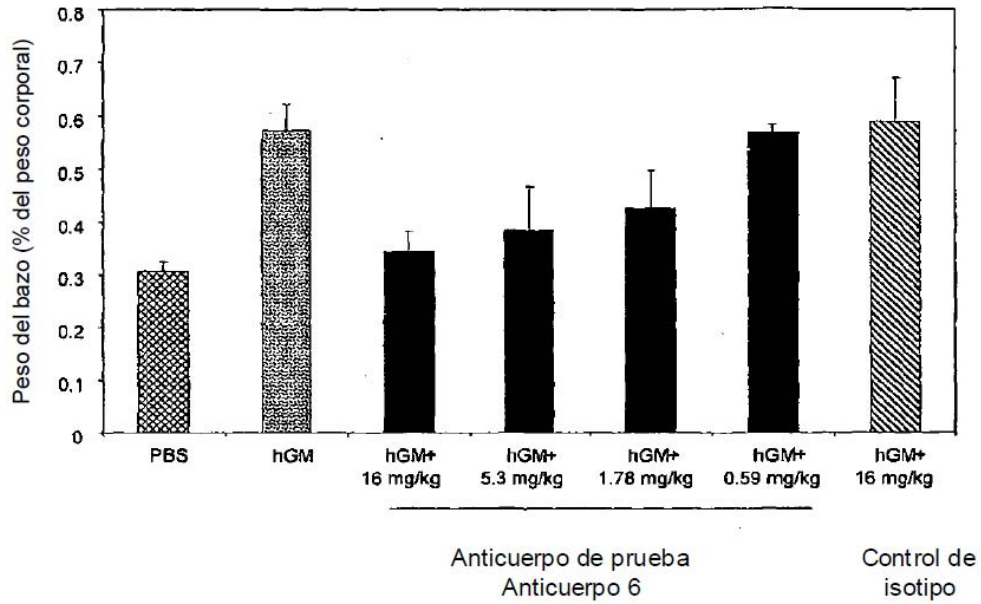
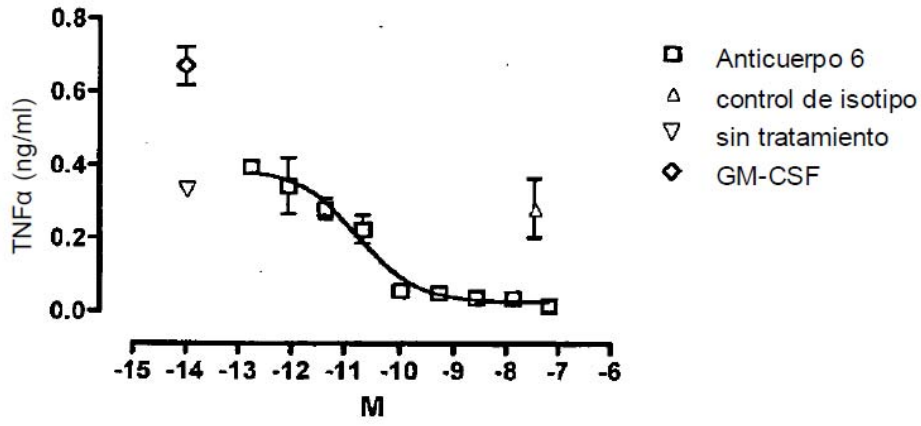


Figura 8

A



B

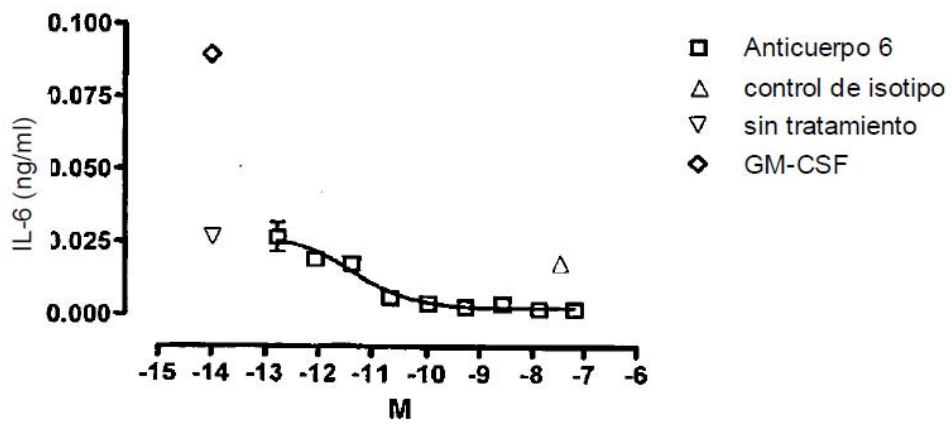


Figura 9