

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 468**

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 11167923 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013** **EP 2423230**

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:
02.10.2013

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;
MINTER, RALPH;
HARRISON, PAULA;
SLEEMAN, MATTHEW;
NASH, ANDREW y
FABRI, LOUIS

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 424 468 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 miembros de unión para la cadena alfa del Receptor del Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos/Macrófagos (GM-CSFR α), especialmente moléculas de anticuerpo anti-GM-CSFR α . También se refiere al uso de estos miembros de unión en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, respiratorias y autoinmunitarias mediadas por GM-CSFR α , incluidas 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 serie de tipos de células hematopoyéticas que incluyen neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y sus células progenitoras. El receptor GM-CSF es un miembro de la superfamilia del receptor de la hematopoyetina. Es heterodimérico, está constituido por una subunidad alfa y una beta. La subunidad alfa es altamente específica para el GM-CSF mientras que la subunidad beta está compartida con otros receptores de citocinas, que incluyen la IL3 y la IL5. Esto se refleja en una distribución en el tejido más amplia de la subunidad beta del receptor. La subunidad alfa, GM-CSFR α , se expresa principalmente en las células mieloides y en 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 está constituida por un péptido señal de 22 aminoácidos (posiciones 1-22), un dominio extracelular de 298 aminoácidos (posiciones 23-320), un dominio transmembrana en las posiciones 321 - 345 y un dominio intra-celular corto 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 el 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 se une 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 mediante su unión inicial a la cadena α de GM-CSFR y el entrecruzamiento posterior 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. [1]. Esta interacción además es capaz de señalizar mediante la fosforilación de tirosina y la activación de la ruta de la cinasa MAP.

35 Patológicamente, se ha demostrado que el GM-CSF desempeña un papel en la exacerbación de las enfermedades inflamatorias, respiratorias y autoinmunitarias. 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 por GM-CSFR.

40 Nicola y col.. [2] han descrito un anticuerpo murino contra el GM-CSFR α humano, que se denominó 2B7-17-A o "2B7", que se ha informado 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 bioensayos diferentes. El anticuerpo 2B7 está disponible comercialmente de Chemicon como MAB1037, y la ficha de especificaciones técnicas para el MAB1037 indica que este es un potente inhibidor de la acción biológica de GM-CSF. El 2B7 se ha descrito también en el documento WO94/09149.

45 Usando una combinación de selecciones de las bibliotecas de fagos scFv vírgenes, mutagénesis aleatoria y ensayos biológicos y bioquímicos diseñados adecuadamente (ver la Parte experimental más abajo), hemos identificado moléculas de anticuerpo muy potentes que se unen al GM-CSFR α humano e inhiben la acción de GM-CSF humano en su receptor. Los resultados presentados en el presente documento indican que nuestros anticuerpos se unen a una región o epítipo diferente de GM-CSFR α en comparación con el anticuerpo 2B7 anti-GM-CSFR α conocido y sorprendentemente, son aún más potentes que 2B7, como se ha demostrado en una diversidad de ensayos biológicos.

55 Un aspecto de la invención es una composición que comprende una molécula de anticuerpo aislada y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo, comprendiendo el dominio VH de anticuerpo las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (CDR) HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y comprendiendo el dominio VL las CDR de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3, donde las secuencias de aminoácidos de las CDR son:

HCDR1 SEQ ID NO: 53

HCDR2 SEQ ID NO: 54

HCDR3 SEQ ID NO: 55

60 LCDR1 SEQ ID NO: 58

LCDR2 SEQ ID NO: 59 y

LCDR3 SEQ ID NO: 60.

65 Los anticuerpos de la invención son particularmente valiosos en la unión a, y neutralización de, GM-CSFR α y, por lo tanto, se usan en tratamientos de enfermedades mediadas por el GM-CSFR α , incluidas enfermedades inflamatorias

y autoinmunitarias, tal como se indica mediante la experimentación contenida en el presente documento 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 nativo a su receptor. Tal como se explica con más detalle más adelante, 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 (AR), el asma, la inflamación de las vías respiratorias inducida por el humo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), reacciones alérgicas, la esclerosis múltiple (EM), 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 . Preferentemente, un miembro de unión de la invención se une a al menos un residuo de Tyr-Leu-Asp-Phe-Gln (YLDFQ), SEC ID N°: 201, en las posiciones 226 a 230 de GM-CSFR α humano maduro (SEC ID N°: 206). El miembro de unión puede unirse a al menos 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 también a residuos flanqueantes adicionales o residuos estructuralmente vecinos en el dominio extracelular de GM-CSFR α .

La unión se puede determinar por cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo se puede usar un análisis de unión a péptidos, tal como un inmunoensayo de unión a enzima (ELISA) basado en PEPSCAN, tal como se describe con detalle en otra parte en el presente documento. En un análisis de unión a péptidos, tal como el tipo proporcionado por PEPSCAN Systems, se examinan sistemáticamente péptidos cortos superpuestos derivados de los antígenos para determinar 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, un análisis de unión a péptidos (por ejemplo, "PEPSCAN") incluye la identificación de (por ejemplo, por medio del uso del ELISA) un conjunto de péptidos a los que se une el miembro de unión, en el que los péptidos tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a los fragmentos de SEC ID N°: 206 (por ejemplo, los péptidos de aproximadamente 15 residuos contiguos de SEC ID N°: 206) y la alineación de los péptidos con el fin de determinar una huella de los residuos unidos por el miembro de unión, en la que la huella comprende los residuos comunes a los péptidos superpuestos. De acuerdo con la invención, la huella identificada mediante el análisis de la unión a péptidos o PEPSCAN puede comprender al menos un residuo de YLDFQ correspondiente a las posiciones 226 a 230 de la SEC ID N°: 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 ID N°: 206 que comprende uno o más, preferentemente todos, los residuos de YLDFQ correspondientes a las posiciones 226 a 230 de la SEC ID N°: 206, por ejemplo, tal como se determina por un procedimiento de análisis de unión a péptidos o PEPSCAN descritos en el presente documento. 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 ID N°: 206, en el que 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 ID N°: 206. Los detalles de un procedimiento de análisis de unión a péptidos adecuado para determinar la unión se exponen con detalle en otra parte en el presente documento. Otros procedimientos que son bien conocidos en la técnica y se podrían usar para determinar los residuos unidos mediante un anticuerpo, y/o para confirmar los resultados del análisis de unión a péptidos (por ejemplo, PEPSCAN), incluyen la mutagénesis dirigida al sitio, el intercambio deuterio-hidrógeno, la espectrometría de masas, la RMN y la cristalografía de rayos X.

En consecuencia, un miembro de unión de la invención neutraliza preferentemente el GM-CSFR α . Neutralización significa 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 medida mediante 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 conoce como su potencia neutralizante. La potencia se puede determinar o medir usando uno o más ensayos conocidos por los expertos y/o como se describe o se menciona en el presente documento. 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

5 ○ Ensayo de formación de colonias (inhibición de GM-CSF in vitro diferenciación mediada por GM-CSF de progenitores de células sanguíneas)

○ Inhibición de la bioactividad de GM-CSF in vivo por ejemplo, en ratones quiméricos con médula ósea transgénica que expresan el GM-CSFR humano

10 ○ Ensayo de liberación de citocina de célula mononuclear de sangre periférica

La potencia se expresa normalmente como un valor de CI50, en pM a menos que se indique lo contrario. En ensayos funcionales, la CI50 es la concentración que reduce una respuesta biológica en un 50 % de su máximo. En los estudios de unión al ligando, la CI50 es la concentración que reduce la unión al receptor en un 50 % del máximo nivel de unión específica. La CI50 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 el 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 expresan el GM-CSFR humano en una prueba de bioactividad) o el % de unión específica al receptor como función del logaritmo de la concentración del miembro de unión y por medio del uso de un programa informático tal como el Prism (GraphPad) para adaptar una función sigmoïdal a los datos para generar valores de CI50.

25 Un valor de CI50 puede representar la media de una pluralidad de mediciones. Así, por ejemplo, los valores de CI50 pueden obtenerse a partir de los resultados de experimentos por triplicado, y después puede calcularse un valor de CI50 promedio.

30 En el ensayo de proliferación de TF-1, los miembros de unión de la invención tienen normalmente una CI50 inferior a 1500 pM. Por ejemplo, la CI50 puede ser < 300, < 60, < 10 o < 1,5 pM, por ejemplo, aproximadamente 1,0 pM. Normalmente, la CI50 es al menos 0,5 o 1,0 nM. El anticuerpo murino 2B7 conocido tuvo una CI50 de aproximadamente 1600 pM en este ensayo. El ensayo de proliferación de TF-1 usado en el presente documento fue con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de CI50 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 detalles, véase la sección de Materiales y procedimientos de ensayo.

40 Un miembro de unión de la invención puede tener un pA₂ más negativo que -6, -7, -8, -9, -10, -10,5 o -11 en el ensayo de proliferación de TF-1. Por ejemplo, pA₂ puede ser aproximadamente -10,5 o -11. El cálculo y la importancia de los valores pA₂ se trata en detalle en la Parte experimental en Materiales y procedimientos de ensayo.

45 En el ensayo del cambio de forma del granulocito humano, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una CI50 inferior a 100 pM, por ejemplo inferior a 50 pM o inferior a 30, 25, 20, 15 o 10 pM. Normalmente la CI50 es al menos 5, 6 o 7 pM. El anticuerpo 2B7 murino conocido, por el contrario, es menos potente con una CI50 medida de 477 pM en este ensayo. El ensayo del cambio de forma del granulocito humano usado en el presente documento se realizó con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de CI50 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 inducido por GM-CSF humano 7 pM. Para más detalles, véase la sección de Materiales y procedimientos de ensayo.

55 En el ensayo de cambio de forma de los granulocitos de cinomolgo, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una CI50 inferior a 20 pM, típicamente inferior a 10, 5 o 2,5 pM. La CI50 puede ser al menos 0,5, 1 o 1,5 pM. El anticuerpo murino 2B7 conocido tuvo una CI50 de 26 pM cuando se analizó en este ensayo. El ensayo del cambio de forma de los granulocitos de cinomolgo usado en el presente documento se realizó con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de CI50 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 detalles, véase la sección de Materiales y procedimientos de ensayo.

60 Un miembro de unión de la invención puede tener un pA₂ más negativo que -6, -7, -8, -9, -10, -10,5 o -11 en el ensayo de cambio de forma humano y/o cinomolgo. Preferentemente el pA₂ es aproximadamente -10 o -11.

En el ensayo de liberación de TNF α de monocitos, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una

CI50 inferior a 150 pM, típicamente inferior a 110 pM, por ejemplo, inferior a 100 pM. La CI50 puede ser al menos 30 o 40 pM. El ensayo de liberación de TNF α de monocitos usado en el presente documento se realizó con una concentración final de GM-CSF humano 1 nM. Así, la potencia de neutralización de CI50 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 estimulada con GM-CSF humanos 1 nM. Para más detalles, véase la sección de Materiales y procedimientos de ensayo.

En el ensayo de supervivencia de granulocitos, los miembros de unión de la invención normalmente tienen una CI50 inferior a 1000pM, típicamente inferior a 850 pM. La CI50 puede ser inferior a 500, 250, 150, 100, 50, 30, 20 o 10 pM. La CI50 puede ser al menos 5 pM. El anticuerpo murino 2B7 conocido es inactivo en este ensayo hasta una concentración 83 nM. El ensayo de supervivencia de los granulocitos usado en el presente documento se realizó con una concentración final de GM-CSF humano 7 pM. Así, la potencia de neutralización de CI50 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 detalles, véase la sección de Materiales y procedimientos de ensayo.

En el ensayo de formación de colonias, los miembros de unión de la invención pueden tener una CI50 inferior a 5, inferior a 2,5, inferior a 1 o inferior a 0,3 μ g/ml. Preferentemente la CI50 es de 0,25 μ g/ml o menor, por ejemplo inferior a 0,1 μ g/ml. La CI50 puede ser al menos 0,05 μ g/ml. El anticuerpo murino 2B7 conocido tiene poca o ninguna actividad en este ensayo hasta una concentración de 10 μ g/ml (67nM). El ensayo de formación de colonias usado en el presente documento se realizó con una concentración final de 10 ng/ml de GM-CSF humano. Así, la potencia de neutralización de CI50 en el ensayo de formación de colonias representa la capacidad de un miembro de unión de inhibir la formación de colonias inducida por 10 ng/ml de GM-CSF humano. Para más detalle ver la sección de Materiales y procedimientos de ensayo.

Un miembro de unión de la invención puede mostrar una capacidad dependiente de la dosis de inhibición del aumento de peso del bazo y/o de inhibición de 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 CI50 para la inhibición del aumento de peso del bazo puede ser inferior a 5, inferior a 2,5, inferior a 2, inferior a 1 o inferior a 0,75 mg/kg. La CI50 puede ser al menos 0,5 mg/kg en algunas realizaciones.

Adicionalmente, la cinética de unión y afinidad de los miembros de unión por el GM-CSFR α humano se puede determinar, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, mediante el uso del BIAcore. Los miembros de unión de la invención normalmente tienen una KD inferior a 4 nM y con mayor preferencia inferior a 3, 2 o 1 nM. Preferentemente, la KD es inferior a 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,15 nM.

Los miembros de unión de la invención normalmente se unen a GM-CSFR α de primate no-humano, por ejemplo, GMCSFR α de cinomolgo, además de a GM-CSFR α humano. Como existe una homología baja entre el receptor de GM-CSF humano y murino (aproximadamente el 36 %), los miembros de unión de la invención generalmente no se unirán ni 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, tal como se trata con más detalle más adelante. Preferentemente, una molécula de anticuerpo de la invención es una molécula de anticuerpo humano.

Un miembro de unión de la invención comprende un dominio de anticuerpo VH y/o VL. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL se encuentran las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), y las regiones estructurales, ("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 una CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco estructural de VH. Alternativa o adicionalmente puede comprender un dominio VL de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco estructural de VL. Un marco estructural del dominio VH o VL comprende cuatro regiones estructurales, 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, las FR y las CDR son los enumerados en el listado de secuencias adjunto que forma parte de la presente descripción. 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 lo contrario, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR. Típicamente los miembros de unión de la invención son anticuerpos monoclonales (mAb).

Tal como se describe con más detalle en la Parte experimental, se identificó un grupo de moléculas de anticuerpos que se unen al GM-CSFR α . Además se identificaron determinados 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 la determinación de la unión

y la especificidad de un miembro de unión, una o más CDR que tienen los residuos apropiados tal como se definen en el presente documento se pueden usar e incorporar a cualquier región estructural adecuada, por ejemplo una región estructural de dominio VH y/o VL de anticuerpo, o una proteína de andamiaje que no sea un anticuerpo, tal como se describe con más detalle en otra parte en el presente documento. Por ejemplo, puede injertarse una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo en un marco estructural (por ejemplo, un marco estructural humano) para proporcionar una molécula de anticuerpo o moléculas de anticuerpos diferentes. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo puede comprender CDR tal como se describen en el presente documento y regiones estructurales de secuencias del segmento génico de la línea germinal humana. Un anticuerpo puede estar provisto de un conjunto de CDR dentro de un marco estructural que se puede someter a transformación a la línea germinal, en la que uno o más residuos dentro del marco estructural se cambian para que correspondan con los residuos presentes en la posición equivalente del marco estructural de la línea germinal humana más similar. Así, las regiones estructurales del anticuerpo son preferentemente de línea germinal y/o humanas.

Llevamos a cabo una investigación sobre qué residuos de un anticuerpo candidato eran importantes para el reconocimiento del antígeno, siguiendo el procedimiento descrito en la sección experimental, y después se realizó el análisis de secuencia de 160 clones que mostraban una potencia al menos 5 veces superior al 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.

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

El residuo de Kabat H17 en la región estructural 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.

La molécula de anticuerpo es preferentemente una molécula de anticuerpo humano que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en una región estructural de la línea germinal humana, p. ej., la región estructural de la línea germinal humana de la familia VH1 o VH3 de cadena pesada. En una realización preferente, la molécula de anticuerpo humano aislado tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en un marco estructural de la línea germinal humana VH1 DP5 o VH3 DP47. Así, las regiones estructurales del dominio VH pueden comprender marcos estructurales del segmento génico de la línea germinal humana VH1 DP5 o VH3 DP47. La secuencia de aminoácidos de la FR1 de VH puede ser la SEC ID N°: 251. La secuencia de aminoácidos de la FR2 de VH puede ser la SEC ID N°: 252. La secuencia de aminoácidos de la FR3 de VH puede ser la SEC ID N°: 253. La secuencia de aminoácidos de la FR4 de VH puede ser la SEC ID N°: 254.

La molécula de anticuerpo tiene además un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, preferentemente en una región estructural de línea germinal humana, por ejemplo un marco estructural de línea germinal humana de la familia de cadena ligera VLambda 1 o VLambda 6. En una realización preferente, la molécula de anticuerpo humano aislado tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR en una región estructural de la línea germinal humana VLambda 1 DPL8 o VLambda 1 DPL3 o VLambda 6_6a. Así, el marco estructural del dominio VL puede comprender regiones estructurales del segmento génico de la línea germinal humana VLambda 1 DPL8, VLambda 1 DPL3 o VLambda 6_6a. La FR4 del dominio VL puede comprender una región estructural del segmento de la línea germinal humana JL2. La secuencia de aminoácidos de la FR1 de VL puede ser la SEC ID N°: 255. La secuencia de aminoácidos de la FR2 de VL puede ser la SEC ID N°: 256. La secuencia de aminoácidos de la FR3 de VL puede ser la SEC ID N°: 257. La secuencia de aminoácidos de la FR4 de VL puede ser la SEC ID N°: 258.

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

Un miembro de unión de la invención puede competir por la unión al GM-CSFR α con cualquier miembro de unión descrito en el presente documento por ejemplo, el anticuerpo 3 o cualquiera de los anticuerpos 1, 2 o 4-20. Por lo tanto, 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 analizarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo, mediante el etiquetado de una molécula comunicadora 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.

La competencia se puede determinar por ejemplo usando 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 mediante una disminución en la señal emitida por el miembro de unión etiquetado. De manera similar, se puede usar un ensayo de resonancia de plasmón superficial para determinar la competencia entre los miembros de unión.

En las pruebas de competencia se puede usar un fragmento de péptido del antígeno, especialmente un péptido que incluye, o que está constituido esencialmente por, un epítipo o región de unión de interés. Se puede usar un péptido que tiene el epítipo o la secuencia diana más uno o más aminoácidos en cualquier extremo. Los miembros de unión de acuerdo con la presente invención pueden ser de tal modo que su unión por el antígeno se inhiba por un péptido con, o que incluye, la secuencia dada.

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

Puede usarse un miembro de unión como los anteriores para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competencia, es decir, un procedimiento para medir el nivel de antígeno en una muestra mediante el uso de un miembro de unión tal 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. Unir la molécula comunicadora al miembro de unión de modo que se produzca un cambio físico u óptico en la unión es una posibilidad. La molécula comunicadora puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferentemente señales medibles. La unión de las moléculas comunicadoras 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 que codifican el anticuerpo y la molécula comunicadora.

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

La unión de un miembro de unión tal como se proporciona en el presente documento 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, inmunotransferencia de tipo Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, o ensayos basados en células tal como un ensayo de TF-1.

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 ensayo, 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 realización 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, tal como se describe más adelante. Los componentes de un kit son generalmente estériles y están en viales u otros recipientes sellados. Los kits se pueden usar en análisis de diagnóstico u otros procedimientos para los que sean útiles las moléculas de anticuerpo. Un kit puede contener instrucciones de uso de los componentes en un procedimiento. Pueden estar incluidos materiales auxiliares para ayudar en, o para permitir realizar, este procedimiento en un kit de la invención.

Las reactividades de los anticuerpos en una muestra se pueden determinar por cualquier medio adecuado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno radiactivo etiquetado se mezcla con el antígeno no etiquetado (la muestra de ensayo) 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. Cuanto más antígeno haya en la muestra de prueba, menos antígeno radiactivo se unirá al anticuerpo. También puede usarse un ensayo de unión competitiva con el antígeno no radiactivo, mediante el uso del antígeno o un análogo unido a una molécula comunicadora. La molécula comunicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o colorante de láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Rojo. Los tintes cromógenos adecuados incluyen diaminobencidina. Otros comunicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas, tales como perlas de látex que son coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológica o químicamente activos que pueden, directa o indirectamente, provocar 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 dan como resultado espectros de absorciones o emisiones característicos. Se pueden incluir entidades químicas que se usan conjuntamente con biosensores. Se pueden usar sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

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

También se describe un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL tal como se establece en el presente documento. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN, y puede ser completa o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se establece en el presente documento 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. El ácido nucleico puede codificar 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 tal como se define en el presente documento. Pueden proporcionarse constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente.

Una célula huésped puede transformarse con, o puede contener, el ácido nucleico. Dicha célula huésped puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo.

Dicho ácido nucleico puede introducirse en una célula huésped. Para la introducción puede usarse 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 huésped, en particular, una célula eucariota, se puede usar un sistema basado en un virus o en un plásmido. El sistema de plásmido se puede mantener en forma episómica o puede incorporarse a la célula huésped o a un cromosoma artificial. La incorporación puede ser por integración, aleatoria o dirigida, de una o más copias en un sitio único o en múltiples sitios. 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 causando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en condiciones para la expresión del gen.

En una realización, 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 también proporciona un procedimiento que comprende el uso de un constructo tal como se ha establecido anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión o polipéptido como anteriormente. Un procedimiento puede comprender expresar dicho ácido nucleico en condiciones adecuadas para provocar la producción de dicho miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL, y recuperarlo. Dicho procedimiento puede comprender cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para la producción de dicho miembro de unión o dominio de anticuerpo.

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

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped 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 procariontes está bien establecida en la materia [3]. Un huésped bacteriano común preferente es *E. coli*.

La expresión en células eucariotas en cultivo además está disponible para los expertos en la técnica 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.

Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, de forma que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluidas 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 víricos, por ejemplo 'fago' según sea adecuado [7]. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica y análisis de las proteínas, se describen con detalle en Ausubel y col. [8].

Pueden obtenerse uno o más miembros de unión capaces de unirse al antígeno mediante un procedimiento que incluye poner en contacto una biblioteca de los miembros de unión de acuerdo con la invención y dicho antígeno, y seleccionar uno o más miembros de unión de la biblioteca capaces de unirse a dicho antígeno.

La biblioteca se puede mostrar en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, paquetes genéticos replicables, tales como partículas de levadura, bacterias o bacteriófagos (por ejemplo, T7), o sistemas de exposición covalentes, ribosómicos u otros *in vitro*, conteniendo cada partícula o complejo molecular el ácido nucleico que codifica el dominio variable VH del anticuerpo que se muestra en ella, y opcionalmente además un dominio VL que se muestra si está presente. Después de la selección de los miembros de unión capaces de unirse al antígeno y que se

muestran en el bacteriófago u otras partículas de la biblioteca o complejos moleculares, el ácido nucleico se puede tomar de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que muestre un miembro de unión seleccionado mencionado. Estos ácidos nucleicos se pueden usar en la producción subsiguiente 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 muestre dicho miembro de unión seleccionado.

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

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

Se puede analizar adicionalmente la capacidad de unión al GM-CSFR α , también 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 analizar.

Las variantes de los dominios VH y VL y CDR de la presente invención, que incluyen aquellas para las que las secuencias de aminoácidos se exponen en el presente documento, se pueden obtener por medio de procedimientos de alteración de la secuencia o mutación y cribado, y se pueden usar en miembros de unión por el GM-CSFR α . Si se sigue el ejemplo de la química informática 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 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.

Un sitio de unión antígeno-anticuerpo compuesto de un dominio VH y un dominio VL está formado por seis bucles 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 (bucle) de los dominios VH, los bucles del sitio de unión tienen una de entre un pequeño número de conformaciones de la cadena principal: estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura canónica formada en un bucle en particular está determinada por su tamaño y la presencia de determinados residuos en sitios claves tanto en el bucle como en las regiones estructurales [16, 17].

Este estudio de la relación secuencia-estructura se puede usar para la predicción de aquellos residuos de un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus bucles de CDR y por lo tanto mantienen la unión. Estas predicciones se pueden respaldar en comparación con 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] usando cualquier paquete libremente disponible o comercial tal como el WAM [19]. Se puede usar un paquete informático de visualización y análisis de proteína tal como el Insight II (Accelrys, Inc.) o el Deep View [20] para evaluar después posibles sustituciones en cada posición de la CDR. Esta información se podría usar después para generar sustituciones que probablemente tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad.

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 técnica. Se pueden realizar variantes de secuencias, con sustituciones que se pueden o no predecir que tendrán un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y analizar la capacidad para unirse a, y/o neutralizar, GM-CSFR α y/o cualquier otra propiedad que se desee.

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

Preferentemente las alteraciones no dan como resultado una 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 a, y/o neutralizar, el GM-CSFR α . Más preferentemente, mantiene la misma capacidad cuantitativa de unión y/o neutralización que el miembro de unión en el que la alteración no se ha realizado, por ejemplo, medida en un ensayo descrito en el presente documento. Del modo más preferente, el miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo, tiene una capacidad mejorada para unirse a, o neutralizar, el GM-CSFR α en comparación con un miembro de unión en el que la alteración no se ha realizado, por ejemplo, medida en un ensayo descrito en el presente documento.

La alteración puede comprender la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos con un aminoácido que no es de origen natural o no es 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 preferentes en las secuencias de la invención se describen en otro lugar en el presente documento. Los aminoácidos naturales incluyen los 20 L-aminoácidos "estándar" 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 estándar de una sola letra. Los aminoácidos no estándar incluyen todos los residuos que se puedan incorporar en un esqueleto de polipéptido u obtenerse como resultado 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. Se conocen en la técnica muchos aminoácidos no estándar de origen natural, tales como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3- metihistidina, N-acetilserina, etc. [21]. Aquellos residuos de aminoácido que son derivatizados en su posición N-alfa se localizarán solamente en el extremo N terminal de una secuencia de aminoácidos. Normalmente en la presente invención un aminoácido es un L-aminoácido, pero en algunas realizaciones 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. Además, se conocen las formas metilada, acetilada y/o fosforilada de aminoácidos, 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 realizaciones los aminoácidos no estándar (por ejemplo, D-aminoácidos) se pueden incorporar a una secuencia de aminoácidos durante la síntesis, mientras que en otras realizaciones los aminoácidos no estándar se pueden introducir por modificación o sustitución del aminoácido "original" estándar después de la síntesis de la secuencia de aminoácidos.

El uso de aminoácidos no estándar y/o no naturales aumenta la diversidad estructural y funcional, y en consecuencia, puede aumentar 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 ha demostrado que los D-aminoácidos y análogos tienen mejores perfiles farmacocinéticos que los L-aminoácidos estándar, debido a la degradación *in vivo* de los polipéptidos que tienen L-aminoácidos después de la administración a un animal.

Tal como se ha indicado anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente tal como se expone en el presente documento se porta preferentemente como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una porción sustancial del mismo. Las secuencias HCDR3 sustancialmente tal como se exponen en el presente documento representan realizaciones preferentes de la presente invención y es preferente que cada uno de estas se porte como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humana o una porción sustancial del mismo.

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

Por ejemplo, Marks y col. (1992) [22] describen procedimientos para producir los repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que los cebadores de consenso dirigidos, o adyacentes, al extremo 5' del área de dominio variable se usan junto con los cebadores de consenso para la tercera región estructural de genes humanos de VH para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de una CDR3. Marks y col. describen además cómo este repertorio puede combinarse 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 VH y VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos mezclados se combinan con un dominio VH o VL análogo para proporcionar los miembros de unión de la invención. El repertorio puede mostrarse después en un sistema de huésped adecuado tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047 o cualquiera de una gran cantidad de referencia de literatura posterior, incluida la ref. [23], de manera que se pueden seleccionar los miembros de unión adecuados. Un repertorio puede estar constituido por cualquier cosa de 10^4 miembros individuales o más, por ejemplo de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros. Otros sistemas huésped adecuados incluyen la presentación en levadura, presentación en bacterias, presentación en T7, presentación vírica, presentación celular, presentación en ribosoma y presentación covalente. El intercambio de análogos o las técnicas combinatorias se ha descrito, también, por Stemmer (1994) [24], que describe la técnica con 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 dentro del dominio variable entero. Esta técnica se ha descrito por Gram y col. (1992) [25], que usan la PCR propensa a errores. En realizaciones preferentes se realizan una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de un conjunto de HCDR y/o LCDR. Otro procedimiento que se puede usar es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de los genes VH o VL [26,27].

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo para GM-CSFR α , como se establece en la reivindicación 13, 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 reivindicación 13 un dominio VH que sea una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH, combinar el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL, como se establece en la reivindicación 13, y analizar 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 preferidas, preferentemente la capacidad de neutralizar la actividad de GM-CSFR α .

Un miembro de unión para el antígeno GM-CSFR α , puede prepararse mediante un procedimiento que comprende:

(a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que incluye una CDR3 que se sustituye o carece de una región codificante CDR3;

(b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente según lo establecido en el presente documento para una CDR3 de VH de tal manera que el ácido nucleico donante se inserta en la región CDR3 del 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 que codifica el mismo.

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

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

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones estructurales intervinientes. Preferentemente, la porción incluirá también al menos aproximadamente el 50 % de una de las regiones estructurales primera y cuarta, o ambas, siendo el 50 % el 50 % C terminal de la primera región estructural y el 50 % N terminal de la cuarta región estructural. Los residuos adicionales en el extremo N terminal o C terminal de la porción sustancial del dominio variable pueden no ser normalmente los asociados con regiones de dominios variables naturales. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión de la presente invención realizada por técnicas de ADN recombinante puede 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 constantes de anticuerpos, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas funcionales/detectables tal como se trata con más detalle en otra parte del presente documento.

Se sabe que los dominios individuales de inmunoglobulina, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse a antígenos diana. Por ejemplo, véase la discusión de dAb en otra parte del presente documento.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios se pueden usar para examinar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaces de unirse a GM-CSFR α . Esto se puede lograr por procedimientos de detección de presentación en fagos usando el llamado doble enfoque combinatorio jerárquico tal como se describe en el documento WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene, bien un clon de cadena H o bien L, se usa para infectar una biblioteca completa de 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 presentación en fagos tales como las descritas en esa referencia y [22].

Otros aspectos de la presente invención proporcionan composiciones que contienen 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. Dichas composiciones de pueden usar en procedimientos de

inhibición o neutralización del GM-CSFR α , que incluyen procedimientos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

5 La invención proporciona preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas del anticuerpo anti-GM-CSFR α . Por ejemplo, estas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C terminal, con distintos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como ciclación de un ácido glutámico N terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico.

10 Se describen en el presente documento procedimientos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión tal como se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos miembros de unión y el uso de dicho miembro de unión en la fabricación de un medicamento, por ejemplo en un procedimiento de fabricación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende la formulación del miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 El tratamiento anti-GM-CSFR α puede administrarse oralmente (por ejemplo nanocuerpos), por inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraarticular, 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 infusión en pulsos, 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, es preferente también la inyección por vía subcutánea usando un dispositivo sin aguja.

25 Una composición se puede administrar sola o en conjunto con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente en función de la afección que se va a tratar. Los tratamientos de combinación se pueden usar para proporcionar efectos sinérgicos significativos, en particular la combinación de un miembro de unión anti-GM-CSFR α con uno o más fármacos adicionales. Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar combinado con, o adicionalmente a, uno o más de los siguientes: NSAID (por ejemplo, inhibidores de la cox tales como Celecoxib y otros similares de los inhibidores de la cox2), corticosteroides (por ejemplo, prednisona) y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) por ejemplo, Humira (adalimumab), metotrexato, Arava, Enbrel (Etanercept), Remicade (Infliximab), Kineret (Anakinra), Rituxan (Rituximab), Orenicia (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 eficaz", siendo esto suficiente para mostrar el beneficio para un paciente. Dichos beneficios pueden ser al menos la mejora 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 está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos de medicina general y de otros médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de la enfermedad que se va a tratar. Las dosis adecuadas de anticuerpos se conocen bien en la técnica [28,29]. Se pueden usar las dosis específicas indicadas en el presente documento o en Physician's Desk Reference (2003) según sea adecuado para el tipo de medicamento que se administra. Una cantidad terapéuticamente eficaz 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 procedimientos para extrapolar las dosis eficaces en ratones y otros animales de ensayo a humanos son conocidos. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, que incluyen si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la ubicación de la zona que se va 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 por vía sistémica y de 1 μ g a 1 mg para aplicaciones por vía tópica. Típicamente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, preferentemente IgG1, IgG2 o más preferentemente IgG4. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que se puede ajustar proporcionalmente para niños y bebés, y también ajustarse 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 realizaciones preferentes 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, más preferentemente aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. En otras realizaciones preferentes de la invención, el tratamiento puede administrarse antes y/o después de la cirugía, y más preferentemente, puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

65 Los miembros de unión de la presente invención por lo general se administran en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender por lo menos un componente, además del miembro de unión. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención y para el uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable,

vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo 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 comprimido, cápsula, polvo, líquido o semisólido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un coadyuvante. 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 sacarido o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. 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 exenta de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad, y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica 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. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Los miembros de unión de la presente invención se pueden formular en forma líquida, semisólida o sólida, dependiendo de las propiedades físico-químicas de la molécula y la vía de administración. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y sustancias tensioactivas. Las formulaciones líquidas pueden incluir una amplia serie de concentraciones de anticuerpos y de pH. Las formulaciones sólidas se pueden producir por liofilización, secado por pulverización 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 por vía pulmonar pueden estar constituidas por partículas con propiedades físicas que garanticen la penetración el pulmón profundo por inhalación; las formulaciones tópicas pueden incluir agentes modificadores de la viscosidad, que prolongan el tiempo que el fármaco reside en el lugar de acción. En determinadas realizaciones, el miembro de unión se puede preparar con un vehículo que protegerá al miembro de unión contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Robinson, 1978 [30].

Los miembros de unión de acuerdo con la invención se pueden usar en un procedimiento de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un procedimiento de tratamiento (que puede incluir el tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un miembro de unión de la invención. Las afecciones que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen cualquiera en la que el GM-CSFR α desempeñe un papel. La literatura técnica publicada indica un papel para el GM-CSF en varias enfermedades y afecciones, tal como se resume más adelante. Debido a 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 . Por lo tanto, la evidencia publicada, adicionalmente a los datos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* presentados para las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento en la parte experimental, indica que los miembros de unión de la invención se pueden usar en el tratamiento de afecciones, enfermedades y trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios, por ejemplo la artritis reumatoide, el asma, reacciones alérgicas, la esclerosis múltiple, la leucemia mieloide y la aterosclerosis. La evidencia publicada sobre estas afecciones se resume a continuación:

Asma y respuestas alérgicas

El asma bronquial es un trastorno inflamatorio común persistente del pulmón caracterizada por vías respiratorias hipersensibles, sobreproducción de moco, fibrosis y niveles elevados de IgE. La hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) es la constricción exagerada de las vías respiratorias a los estímulos no específicos. Se piensa que tanto la AHR como la sobreproducción de moco son los responsables de la obstrucción variable de las vías respiratorias que conduce a la falta de aliento característica 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 están regulados al alza tanto a nivel de proteína como de ARNm en el asma. Además, los niveles de expresión se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. El aumento en la producción de GM-CSF se ha medido en el lavado broncoalveolar (BAL), las células de BAL, el esputo, las células epiteliales bronquiales y las células mononucleares de sangre periférica estimuladas por el antígeno en pacientes con asma en comparación con los sujetos no asmáticos [31,32]. Además, se ha mostrado que el nivel de expresión de GM-CSF en las vías respiratorias después de la provocación con alérgeno se correlaciona con el grado de eosinofilia del tejido y la gravedad de la respuesta asmática de fase tardía [33]. Estudios posteriores vinculan la expresión de GM-CSFR regulada al alza con el asma intrínseca o no atópica, correlacionándose los niveles de expresión con los datos de función pulmonar [34]. En un modelo de ratón de sensibilización y provocación con ovoalbúmina, la neutralización de la actividad de GM-CSF con un anticuerpo policlonal de cabra, mediante la administración intranasal antes de la provocación con ovoalbúmina, previno la hiper-sensibilidad de las vías respiratorias y redujo tanto la infiltración de eosinófilos como 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 diésel, la neutralización de GM-CSF de nuevo mediante la administración

intranasal de un anticuerpo policlonal de cabra previno la hipersensibilidad de las vías respiratorias a la metacolina, redujo los conteos de eosinófilos en BAL y además disminuyó la expresión de células caliciformes productoras de moco en el epitelio de las vías respiratorias [36].

- 5 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 no son capaces de producir inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. La expresión de pulmón de GM-CSF mediante 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 caliciformes 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. Otro trabajo con este modelo, usando un ratón MHC II KO, indica que el GM-CSF modula la interacción entre las células que presentan antígeno y los linfocitos T de las vías respiratorias, facilitando, por lo tanto, la respuesta a la ovalbúmina mediada por linfocitos T [37]. Significativamente, la actividad de GM-CSF como potente activador de la respuesta Th2 se puede demostrar también 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.

- 20 Se han realizado 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 reexposición 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. Por el contrario, 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 porta el transgén de GM-CSF, dio como resultado una mejora considerable de la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias y las respuestas de memoria de Th2 específica de ambrosía.

Artritis reumatoide (AR)

- 30 La AR es una enfermedad inflamatoria crónica y destructora de las articulaciones que afecta aproximadamente 1 % de la población en el mundo industrializado. La AR 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 una incapacidad importante.

- 35 Mientras que la causa de la AR permanece desconocida, hay una acumulación de evidencias del papel de GM-CSF en la progresión de la AR. Se cree que la AR se inicia y se conduce a través de un proceso antígeno-específico, mediado por los linfocitos T. En resumen, se piensa que la presencia de un antígeno no identificado en un huésped susceptible inicia una respuesta de linfocitos T que conduce a la producción de citocinas de linfocitos T con el consiguiente reclutamiento de células inflamatorias, incluidos neutrófilos, macrófagos y células B.

- 40 Muchas citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se producen en la articulación reumatoide. Además, la progresión, reactivación y silenciamiento de la enfermedad están mediados por los cambios dinámicos en la producción de citocinas dentro de la articulación. Particularmente, se considera que el TNF- α y la IL-1 ejercen un papel fundamental en la patogénesis de la AR y muchas de las terapias más nuevas desarrolladas o en desarrollo de la enfermedad buscan inhibir la actividad de estas dos citocinas proinflamatorias.

- 45 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 AR. La administración exógena de GM-CSF recombinante mejora la patología en dos modelos de AR 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 con GM-CSF inactivado (GM-CSF^{-/-}) son resistentes al desarrollo de la CIA y que los niveles de la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF α) encontrados en el líquido articular sinovial se redujo en comparación con los ratones de tipo silvestre [41,42]. De manera similar, la inducción de la monoartritis por medio del uso de inyección por vía intraarticular de albúmina de suero bovino metilada y la IL-1 en ratones GM-CSF^{-/-} dio como resultado una reducción de la gravedad de la enfermedad en comparación con ratones de tipo silvestre [43].

- 55 Además, la administración del mAb 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 mAb 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 con el mAb antes de la aparición de la artritis disminuye la gravedad de la enfermedad CIA [44,43].

- 65 Mediante una serie de estudios se han analizado los niveles de citocinas y receptores presentes en el líquido sinovial de artritis y en muestras de biopsias de membrana de tejido humano. Las células mononucleares circulantes de 27 pacientes con AR, 13 voluntarios sanos y 14 pacientes con osteoporosis se evaluaron para determinar los niveles de GM-CSFR mediante el uso de GM-CSF etiquetado con PE [45]. En este estudio se demostró que se detectaron el doble de células receptores positivas en los pacientes con AR (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 de pacientes con AR [46] por medio del uso de la hibridación *in situ* de células SF mostró niveles elevados de GM-CSF, la IL-1, el TNF- α y la IL-6. Además, los sinoviocitos derivados de fibroblastos aislados y cultivados de voluntarios normales demostraron elevados niveles de proteína de GM-CSF en respuesta a 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 con AR [48] mostró que los niveles de proteína se incrementaron en los pacientes con AR grave (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 AR (1300 pg/ml).

Previamente se había observado que la administración de GM-CSF recombinante en pacientes tratados por neutropenia podría causar una exacerbación de la AR [49]. Se hicieron observaciones similares para un paciente con síndrome de Felty después del tratamiento con el GM-CSF recombinante [50].

15 *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)*

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) se define como un estado de enfermedad caracterizado por una limitación del flujo de aire que no es completamente reversible. La limitación crónica del flujo de aire es habitualmente 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 en los Estados Unidos. La enfermedad se trata actualmente con fármacos desarrollados originalmente 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 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 está predominantemente mediada por neutrófilos [52]. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para la COPD que se dirijan específicamente a los procesos inflamatorios que subyacen a la fisiopatología de esta enfermedad. El GM-CSF, a través de su papel en la función de los macrófagos y neutrófilos, puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la COPD.

En un estudio que usa la PCR cuantitativa se demostró que en la misma edad, en la comparación del esputo de la COPD frente al 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, 4 h y 1 h antes de la exposición al humo demostraron una reducción importante en los neutrófilos, los macrófagos y los niveles de MMP-9 en el BAL en comparación con el anticuerpo de control de isotipo 5 días después de la provocación [54]. Estos estudios se apoyan, además, en las propias observaciones de la investigación de los niveles de GM-CSF en el esputo inducido en pacientes con una amplia serie de niveles de gravedad de la COPD. En estos estudios se demostró que el GM-CSF estaba elevado en el esputo de aproximadamente el 40 % de los pacientes de COPD analizados independientemente de la gravedad de la enfermedad, aproximándose los niveles de GMCSF a 500 pg/ml en algunos casos. El GMCSF no parecía estar elevado en pacientes no fumadores y fumadores en comparación con los de control. 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.

Esclerosis múltiple (EM)

El GM-CSF se ha implicado en la enfermedad autoinmunitaria esclerosis múltiple. Mediante la administración del antígeno glucoproteína mielina de oligodendrocitos (MOG) a roedores se puede inducir un modelo de esclerosis múltiple humana que muestra muchos de los fenotipos de la EM tales como la inflamación del sistema nervioso central y la desmielinización que pueden tener como consecuencia una parálisis similar a la EM. 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 los linfocitos T al antígeno MOG y una disminución en la producción de las citocinas de Th1 IL-6 y IFN- γ . La administración de anticuerpos neutralizantes GM-CSF al mismo tiempo que la provocación 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].

Leucemia

El GM-CSF se ha implicado también 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. Progenitores de granulocitos y macrófagos de sangre periférica (CFU-GM) *in vitro* 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 está mediada por 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, han demostrado que mediante la inhibición de la acción de GM-CSF se puede reducir significativamente la carga celular 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 el establecimiento de progenitores de JCML 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 coinjertados 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 vieron afectadas.

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, teniendo lugar la acumulación de células inflamatorias junto con la acumulación de lípidos en las paredes arteriales.

Una vez residentes en las células inflamatorias de las paredes arteriales, como los monocitos y macrófagos, participan en, y perpetúan, la respuesta inflamatoria local. Estos macrófagos además expresan receptores secuestrantes para una serie de lipoproteínas y contribuyen, de este modo, a la diferenciación de las células en 'células espumosas'. Es la muerte de estas "células espumosas" lo que contribuye al desarrollo del núcleo de lípidos, una característica clásica de estas lesiones. Mientras 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, tales como el factor tisular, en el vaso, estimulando la cascada de la coagulación y desarrollando el trombo. La trombosis arterial resultante puede conducir después 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 colocaliza 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 aumenta además en los vasos ateroscleróticos humanos en los sitios de acumulación de macrófagos y dentro de las SMC mediales y 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", es decir, macrófagos que han captado lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL) a través de los receptores secuestrantes de la superficie. In vitro, esta captación de Ox-LDL puede estimular además a los macrófagos a proliferar mediante un mecanismo dependiente de GMCSF [67]. Como la aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico, se han investigado agentes antiinflamatorios tales como los glucocorticoides. 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 misma se ha atribuido a la inhibición de la migración [72] y la proliferación [73] de SMC y a 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 de macrófagos peritoneales de ratón [75]. Además, después del tratamiento con dexametasona esta liberación de GM-CSF se inhibió en función 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" cuando se usa en el presente documento 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, como si cada uno se expusiese de forma individual en este documento.

GM-CSFR α y GM-CSF

CSFR α es la cadena alfa del receptor para el factor de estimulación de la colonias de granulocitos macrófagos. La secuencia de longitud completa de GM-CSFR α humano está depositada con el número de Acceso S06945 (gi:106355) [76] y se expone en el presente documento como la SEC ID N°: 202. La forma madura de GM-CSFR α

humano, es decir, con el péptido señal escindido, se expone en el presente documento como la SEC ID N°: 206. A menos que el contexto indique lo contrario, las referencias en el presente documento a GM-CSFR α se refieren a GMCSFR α de primate humano o no humano (por ejemplo, cinomolgo), normalmente humano. El GM-CSFR α puede ser GMCSFR α de origen natural o GM-CSFR α recombinante.

5 El dominio extracelular de 298 aminoácidos del receptor α de GM-CSF humano tiene la secuencia de aminoácido SEC ID N°: 205.

10 A menos que el contexto indique lo contrario, las referencias en el presente documento a GM-CSF se refieren a GM-CSF de primate humano o no humano (por ejemplo, cinomolgo), normalmente humano.

15 El GM-CSF normalmente se une a la cadena alfa del dominio extracelular (SEC ID N°: 205) del receptor GMCSF maduro (SEC ID N°: 206). Tal como se describe en otra parte en el presente documento, los miembros de unión de la invención inhiben esta unión.

20 Se han identificado variantes de ajuste de GM-CSFR α de origen natural (véase, por ejemplo, las refs. [77 y 78]). El dominio extracelular está muy conservado en estas variantes de ajuste. Los miembros de unión de la invención pueden o no unirse a una o más variantes de ajuste de GM-CSFR α , y pueden o no inhibir la unión de GM-CSF a una o más variantes de ajuste de GM-CSFR α .

Miembro de unión

25 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.

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

35 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 peptídico). 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 el que 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.

45 Aunque, tal como se indicado, las CDR pueden ser portadas por andamiajes 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 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 col., 1987 [98], y las actualizaciones del mismo, ahora disponible en Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>) o encontrar "Kabat" usando cualquier buscador).

50 Los miembros de unión de la presente invención pueden comprender, además, las regiones constantes o porciones de las mismas, preferentemente regiones constantes de anticuerpos humanos o porciones del mismo. Por ejemplo, se puede unir un dominio VL 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 isotipos, particularmente IgG1, IgG2 e IgG4. Son preferentes IgG1, IgG2 o IgG4. La IgG4 es preferente porque no se une al complemento y no crea funciones efectoras. Cualquier variante de la región constante sintética o de otro tipo que tiene estas propiedades y estabiliza las regiones variables también es preferente para su uso en las realizaciones de la presente invención.

65 Los miembros de unión de la invención se pueden etiquetar con una etiqueta detectable o funcional. Las etiquetas detectables incluyen radiomarcadores tales como ¹³¹I o ⁹⁹Tc, que se pueden unir a los anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica de la representación óptica por anticuerpos. Las etiquetas además incluyen etiquetas enzimáticas tales como la peroxidasa de rábano picante. Las etiquetas incluyen, además,

restos químicos, tales como la biotina que se pueden detectar a través de la unión a un resto específico 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 incluye, pero sin limitarse a, la biotina, el fluorocromo, la proteína fluorescente verde. Además, la etiqueta puede comprender un resto de toxina tal como un resto de toxina seleccionado 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 inmunoconjugado.

Molécula de anticuerpo.

Esta expresión describe una inmunoglobulina tanto natural como producida total o parcialmente de forma sintética. El término además abarca cualquier polipéptido o proteína que comprenda 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 de otro tipo y usar técnicas de la tecnología del ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retengan la especificidad del anticuerpo original. Estas técnicas pueden implicar la introducción de ADN codificante de la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-239400, GB 2188638A o EP-A-184187, y un gran cuerpo de literatura subsiguiente. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo pueden someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la unión a la 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 abarca cualquier miembro de unión o sustancia que tenga un sitio de unión antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos y derivados, que incluyen cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión antígeno-anticuerpo, tanto natural como 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 los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y un gran cuerpo de literatura posterior.

Otras técnicas disponibles en la técnica de ingeniería genética de anticuerpos permitieron aislar anticuerpos humanos y humanizados. Los anticuerpos humanos y humanizados son realizaciones preferentes de la invención y se pueden producir por medio del uso de cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, se pueden fabricar hibridomas humanos [83]. La presentación en fagos, otra técnica establecida para la generación de los miembros de unión, se describe con detalle en varias publicaciones tal como ref. [83] y el documento WO92/01047 (tratado más adelante). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos de ratón están inactivados y sustituidos funcionalmente por genes de anticuerpos humanos mientras se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón, se pueden usar para aislar anticuerpos humanos [84]. Los anticuerpos humanizados pueden producirse usando técnicas conocidas en la técnica tales como las descritas en, por ejemplo, los documentos WO91/09967, US 5,585,089, EP592106, US 565,332 y WO93/17105. Adicionalmente, el documento WO2004/006955 describe procedimientos para humanizar anticuerpos, basados en la selección de secuencias estructurales 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 biblioteca 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 estructurales humanos. Los miembros del subgrupo, además, se pueden clasificar por similitud de aminoácidos entre las secuencias de CDR humana y no humana. En el procedimiento del documento WO2004/006955, se seleccionan secuencias humanas de clasificación superior para proporcionar las secuencias estructurales para la construcción de un anticuerpo quimérico que funcionalmente sustituye las secuencias de las CDR humanas con las equivalentes de CDR no humanas mediante el uso del miembro que se selecciona del subconjunto de marcos estructurales humanos, de tal modo se proporciona un anticuerpo humanizado de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar las secuencias estructurales entre los anticuerpos no humanos y humanos. También se describen anticuerpos quiméricos que se fabrican según el procedimiento.

Se pueden crear moléculas sintéticas de anticuerpos mediante 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 pueden realizar la función de unión a los

antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab constituido por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd constituido por los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv constituido por los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb [87, 88, 89] constituido por 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 mediante 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 (documento 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 mediante la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL [93]. También se pueden fabricar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 [94].

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un pequeño fragmento monomérico de unión al antígeno de un anticuerpo, es decir, la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo [89]. Los dAb de VH 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, aislando células B específicas para el antígeno y clonado directamente los genes de los dAb a partir de células B individuales. Los dAb 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 el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente según se establece en el presente documento. Por "sustancialmente según se establece" significa que el dominio CDR o VH o VL relevante de la invención será idéntico o muy similar a las regiones especificadas de las que se establece la secuencia en el presente documento. Por "muy similar" se contempla que se pueden realizar de 1 a 5, preferentemente de 1 a 4 tal como 1 a 3 o 1 o 2, o 3 o 4, sustituciones de aminoácido en la CDR y/o el dominio VH o VL.

Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos anticuerpos pueden ser biespecíficos convencionales que se pueden fabricar en una variedad de formas [95], por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos que se han mencionado anteriormente. Los 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, pueden ser también 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 presentación en fagos (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si uno de los brazos del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, dirigido contra GM-CSFR α , entonces se puede fabricar una biblioteca en la que el otro brazo es variado y se selecciona un anticuerpo de unión específica adecuada. Los anticuerpos completos biespecíficos se pueden fabricar por ingeniería de botón en ojal [96].

Sitio de unión al antígeno

Esta expresión 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 es complementaria a la totalidad o a 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 el presente documento, se refieren generalmente al uso de la numeración de Kabat tal como se define por Kabat y col., 1971 [97]. Ver además las referencias. [98, 99].

Aislado

Este término se refiere al estado en el que los miembros de unión de la invención, o ácido nucleico codificante de dichos miembros de unión, estarán por lo general de acuerdo con la presente invención. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado, estará exento o sustancialmente exento del material con el que se asocian naturalmente dichos 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*. Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o coadyuvantes y todavía, a efectos prácticos aislarse; por ejemplo, los miembros normalmente se

mezclan con la gelatina o con otros vehículos si se usan para cubrir las placas de microvaloración para su uso en inmunoensayos, o se mezclan con vehículos farmacéuticamente aceptables o diluyentes cuando se usan en diagnóstico o tratamiento. Los miembros de la unión pueden estar glucosilados, ya sea de forma 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 glucosilados.

Breve descripción de las figuras

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 valorada y se calculó la CE50 de GM-CSF para 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 .

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 CE50 de GM-CSF en cada concentración de anticuerpo (gráfico 2A y gráfico 2B). Después se calcularon las proporciones de dosis y se analizaron por regresión de Schild con el fin de obtener los valores de pA_2 (gráfico 2C y gráfico 2D).

Figura 3. 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.

Figura 4. 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 GM-CSF humano 7 pM. 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 típica de las determinaciones por triplicado dentro del mismo experimento.

Figura 5. 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 GM-CSF humano 1nM. 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 típica de las determinaciones por triplicado dentro del mismo experimento.

Figura 6. 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 GM-CSF humano 7pM. 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 típica de las determinaciones por triplicado dentro del mismo experimento.

Figura 7. Los mAb humanos de afinidad madurada, el Anticuerpo 1 y el Anticuerpo 6, pero no el mAb 28G5 humano parental (Anticuerpo 3) o el anticuerpo murino 2B7 conocido, inhiben la diferenciación de las células progenitoras hemopoyéticas impulsada por el GM-CSF. Se cultivaron 5×10^4 células mononucleares descongeladas a partir de una muestra de aféresis en agar semisólido en presencia de 10 ng/ml de GM-CSF y la concentración indicada de mAb. Las colonias se contaron el día 14. El gráfico muestra el número de colonias frente a la concentración de mAb en $\mu\text{g/ml}$.

Figura 8. Análisis de dosis-respuesta de la eficacia del mAb de afinidad madurada en los ratones quiméricos huGMCSFR 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 bien el mAb de control (CAT001) o bien de ensayo (Anticuerpo 6) a las concentraciones indicadas en D.0. Los pesos del bazo se evaluaron en D.5.

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 se realizó un ELISA de TNF α en el sobrenadante. Los datos representan la inhibición media con barras de desviación típica de las determinaciones por duplicado dentro del mismo experimento.

Parte experimental

Antecedentes

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-humanas y se puede adaptar para obtener anticuerpos de características de afinidad particular.

5 Los fragmentos de anticuerpos que están constituidos solo por 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, se ha demostrado que el scFv tanto se pliega correctamente como se une al antígeno. Se han construido de esta manera grandes repertorios de scFv humano y han proporcionado una fuente a partir de la que se pueden aislar clones individuales para el desarrollo como fármacos candidatos. Los scFv
10 candidatos después se reformatean como moléculas de IgG enteras (típicamente IgG humana) para aplicaciones terapéuticas.

Sumario

15 Las selecciones se llevaron a cabo en una biblioteca de presentación en fagos de scFv derivados de linfocitos de bazo humano con el fin de enriquecer las poblaciones de fagos que se unen al GM-CSFR α humano. Se aislaron anticuerpos scFv que tienen las características seleccionadas y estos scFv se convirtieron en IgG4. Usando una diversidad de ensayos, se aisló un panel de anticuerpos, se optimizaron y se transformaron a la línea germinal para producir IgG4 con la especificación adecuada para un anticuerpo terapéutico.

20 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 anticuerpo parental se muestra como anticuerpo 3 en el listado de secuencias, y además se denomina en el presente documento 28G5. Se seleccionaron los 19 clones que mostraban propiedades particularmente buenas en una serie de ensayos biológicos, tal como se describe en la parte
25 experimental, y se designaron los anticuerpos números 1, 2 y 4 a 20.

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. Protocolos detallados de los procedimientos de ensayo usados se proporciona más abajo en la sección titulada "Materiales y procedimientos de ensayo".

Aislamiento de anticuerpos guías

35 Se usó para las selecciones una gran biblioteca de anticuerpo humano de cadena sencilla FV (scFv). Esta se obtuvo a partir de linfocitos de bazo de 20 donantes sanos y se clonó en un vector fagémido. Los scFv que reconocen el GMCSFR α se aislaron a partir de la biblioteca de presentación en fagos en una serie de ciclos de selección repetidos con el GMCSF-R α purificado derivado de la sobreexpresión de un dominio extracelular con etiqueta de purificación soluble del receptor en las células HEK293T. Esto se logró esencialmente tal como se describe en
40 Vaughan y col. [102]. En resumen, después de la exposición del receptor biotinilado a la biblioteca de fagos, la proteína con el fago unido se capturó en perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Los fagos no unidos se retiraron por lavado. Después los fagos unidos se rescataron tal como ha descrito Vaughan y col. y el proceso de selección se repitió. Se llevaron a cabo tres rondas de selección en concentraciones de antígeno reducidas. 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 biblioteca de presentación en fagos, se identificó un panel de scFv individuales en un ensayo de unión al 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 de 0,65 a 3,3 nM.

55 Los anticuerpos que estaban activos en el ensayo bioquímico de unión al ligando se evaluaron para determinar 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. La TF-1 es una línea celular humana premeleioide establecida a partir de un paciente con eritroleucemia. Esta línea celular es dependiente del factor para la supervivencia y la proliferación y de forma rutinaria 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 valorada en el ADN recién sintetizado de las células en división. Todos los scFv tenían una potencia medible en este ensayo, con valores de CI50 que estaban en el intervalo de aproximadamente 180 a 1.200 nM.

65 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 tal como describen Persic y col.. [100] con unas pocas modificaciones. Se incluyó en los vectores un fragmento oriP para facilitar el uso con las células HEK-EBNA 293 y permitir la replicación episómica. 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 cotransfectaron con los constructos que expresaban la cadena pesada y ligera y el anticuerpo entero se purificó a partir del medio condicionado usando cromatografía de afinidad de proteína A. Las preparaciones de anticuerpos purificadas se filtraron de forma estéril y se almacenaron a 4 °C en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la evaluación. La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm por medio del uso del procedimiento 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 CI50 que estaban en el intervalo de 6 a aproximadamente 1600 nM.

En enfermedades inflamatorias, el cambio de forma de los neutrófilos es necesario para su reclutamiento en el sitio de acción. Se diseñó un ensayo de cambio de forma de granulocitos humanos 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 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 al cambio de forma de los neutrófilos a GM-CSF y los valores de CI50 de los clones seleccionados variaron 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 CI50 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 al receptor de los anticuerpos se midió después por medio del uso del BIAcore, con valores calculados de K_D que estaban en el intervalo de 32 a 377 nM.

Optimización

En un esfuerzo para mejorar la potencia de 28G5 se inició un programa de optimización. Las bibliotecas 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 bibliotecas H1 (bloque N terminal de 6 aa en CDR3 de V_H), H2 (bloque C terminal de 6 aa en CDR3 de V_H), L1 (bloque N terminal de 6 aa en CDR3 de V_L) y L2 (bloque C terminal de 6 aa en CDR3 de V_L). Las bibliotecas resultantes se sometieron a ciclos repetidos de selección para determinar la unión al GMCSFR α humano. Los clones aislados a partir de este proceso de selección se usaron después para construir una biblioteca de fagos combinada que contenía scFv con las CDR3 de cadena pesada mutadas y las CDR3 de cadena ligera mutadas. Estas bibliotecas se sometieron también al mismo procedimiento de selección.

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

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 CDR3 de V_H se aleatorizó.

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 CDR3 de V_L se aleatorizó.

Después de la combinación de las bibliotecas de mutagénesis aleatoria de CDR3 de la cadena pesada y ligera, se identificó un panel de scFv 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 bibliotecas 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 biblioteca de L1.

Un panel de 19 scFv identificados durante la optimización de 28G5 se reformatearon y se expresaron como IgG4, usando los procedimientos descritos anteriormente. El panel estaba compuesto por clones de los anticuerpos 1, 2 y 4 a 20. Algunos de los clones más potentes de este panel se obtuvieron a partir de las bibliotecas mutagenizadas de CDR3 de H y L combinadas. Los anticuerpos IgG4 de 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 CI50 calculada de aproximadamente 1,6 nM, mientras que los clones tenían valores de CI50 calculados que estaban en el intervalo de aproximadamente 1 pm a aproximadamente 1100 pM. Los datos se presentan en la Tabla 1 más adelante y se resumen como sigue a

continuación:

CI50 < 1500 pM Anticuerpos 1, 2 y 4 a 20

5 CI50 < 300 pM Anticuerpos 1, 2, 4-12 y 14-20

CI50 < 60 pM Anticuerpos 1, 2, 4-6, 8-11, 14 y 16-20

CI50 < 10 pM Anticuerpos 1, 5, 6, 11 y 20.

10 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.

15 Se usó el sistema BIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor) para evaluar los parámetros cinéticos de la interacción de algunas de las IgG4 de optimización guiada con el dominio extracelular del receptor de GM-CSF recombinante con etiqueta de purificación. La afinidad de los anticuerpos se mejoró mucho, con valores de K_D 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 ($p < 0,0001$). Mediante comparación, la K_D de 2B7 se calculó por separado y se demostró que era aproximadamente 7 nM.

20 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 CI50 en el intervalo de 7,8 a 90 pM. De éstos, los anticuerpos 1, 2, 5, 6, 9, 16 y 20 tenían las CI50 inferiores a 50 pM, y los anticuerpos 1, 2, 6, 16 y 20 tenían las CI50 inferiores a 25 pM. Nuestros anticuerpos fueron más potentes que 2B7, que tenía una CI50 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.

25 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 CI50 de 26 pM mientras los anticuerpos representativos (Anticuerpo 6, Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2) del panel tenían valores de CI50 de 1,73, 2,03 y 3,2 pM, respectivamente.

30 Un panel de las IgG4 identificadas durante la optimización de 28G5 se evaluaron para determinar sus potencias de neutralización en el ensayo de liberación de $TNF\alpha$ de monocitos. Este ensayo examina su capacidad para inhibir la liberación del factor proinflamatorio $TNF\alpha$ de monocitos humanos cuando se tratan con GM-CSF. Los anticuerpos 1, 2, 5, 6, 9 y 10 se analizaron, y todos eran activos en este ensayo y fueron capaces de neutralizar completamente la acción de GM-CSF en su receptor (la CI50 se encontraba en el intervalo de aproximadamente 43 a 139) mientras que a una concentración 333 nM, 2B7 sólo podía lograr el 50 % de inhibición de la liberación de $TNF\alpha$ 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 $TNF\alpha$ de monocitos. Los datos se muestran en la Tabla 4 y se resumen como sigue a continuación:

< 150 pM Anticuerpo N° 1, 2, 5, 6, 9 y 10

50 < 110 pM Anticuerpo N° 1, 2, 5, 6 y 9

< 100 pM anticuerpo N° 1, 5, 6 y 9

55 Una característica de las enfermedades inflamatorias 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 de este modo se evaluó la capacidad de los anticuerpos IgG4 aislados durante la optimización de 28G5 para inhibir esta respuesta en un ensayo de supervivencia de granulocitos. Todas las IgG4 anti-GM-CSFR α a partir de la optimización guiada fueron activas en este ensayo, y las potencias de neutralización representativas (CI50) se encontraban en el intervalo de 7,0 a 843,7 pM. Esto está en oposición con el anticuerpo murino 2B7 conocido, que fue completamente inactivo hasta una concentración de 83 nM. 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.

65 Estos datos, tal como se ilustra en las Figuras 3 a 6, indican que nuestros 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 GM-CSF 7 pM 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 nuestros anticuerpos). Los datos indican que los miembros de unión de la invención tienen una mayor afinidad y una capacidad mejorada para inhibir una diversidad de efectos biológicos mediados por 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 línea germinal más cercana por similitud de secuencia. La línea germinal más cercana para el dominio VH de 28G5 y sus derivados se identificó como VH1 DP5. El VH de 28G5 tiene 14 cambios con respecto a la línea germinal de VH 1-24 (DP5) dentro de las regiones estructurales. La línea germinal más cercana para el dominio VL es VLambda1 VL 1-e (DPL8), que tiene solamente 5 cambios con respecto a la línea germinal dentro de las regiones estructurales. Las regiones estructurales de 28G5 y sus derivados se retornaron a la línea germinal mediante la mutagénesis dirigida al sitio para que se correspondieran idénticamente con los anticuerpos humanos naturales. Todos excepto un aminoácido se pudieron 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 (usando la numeración de Kabat, Kabat y col., 1971) no se pudo cambiar a 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 estructural 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 pA₂ calculados de -11,3±0,2 y -11,0±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 ser 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. Se evaluaron, por lo tanto, el Anticuerpo 6 y el Anticuerpo 1 de afinidad madurada, el mAb parental Anticuerpo 3 (28G5) y un control negativo (CAT001) para determinar su capacidad para antagonizar la actividad específica de GM-CSF usando células progenitoras derivadas de sangre periférica, en un ensayo de formación de colonias. Los datos presentados en la Figura 7 demuestran que ambos mAb 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 CI50 fueron 0,08 µg/ml (Anticuerpo 6) y 0,25 µg/ml (Anticuerpo 1) para el mAb 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 66 nM.

En experimentos de control el mAb no tuvo efecto en la formación de colonias mediada por la combinación de SCF + IL-3 + G-CSF, tal 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 de mAb específica de huGM-CSFR α , el trasplante de médula ósea a partir de ratones transgénicos (Tg) que expresan tanto la cadena α como la β de GM-CSFR humano en ratones de tipo silvestre se puede usar para generar animales quiméricos de forma que la expresión de huGM-CSFR transgénico se limite a las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea y así se asemeje 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 mAb de control negativo, CAT001 se evaluaron para determinar 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 durante 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 mAb de prueba (Anticuerpo 6) a 16 mg/kg, 5,3 mg/kg, 1,78 mg/kg o 0,59 mg/kg el D.0, mientras un quinto grupo de animales tratados con huGM-CSF recibieron el control CAT001 a 16 mg/kg el D.0. 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. Tal como se esperaba, el tratamiento con 16 mg/kg del control CAT001 no tuvo efecto ni en el aumento de peso del bazo ni en la disminución de los monocitos de la sangre. Por el contrario, hubo un claro efecto dosis-respuesta tras el tratamiento con el mAb de ensayo Anticuerpo 6, debido a que a 16 mg/kg este anticuerpo suprimió el aumento de peso del bazo y, aunque era evidente, el efecto se redujo en gran medida a 0,59 mg/kg del mAb. La CI50 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 mAb de ensayo Anticuerpo 6 a 16 mg/kg abolió la disminución, mientras el mAb 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 GMCSFR α humano *in vivo*.

5 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 dependiendo del donante. En este ensayo el GM-CSF se produce también 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 dependiente de la dosis tal 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 proinflamatorias claves, tales como la IL-6 y el TNF α , ambos implicadas en un número de indicaciones inflamatorias tales como la artritis reumatoide.

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

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

25 Determinamos la variabilidad de residuos en posiciones de 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 al ligando y las posiciones que son variables en un anticuerpo que aún conserva la actividad de unión al ligando.

Las posiciones que contribuyen a la unión al 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.

30 Se identificaron siete posiciones que parecían ser importantes para la unión al 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, todas las cuales mostraron una mejora mínima de 5 veces en la potencia en el ensayo de proliferación de TF-1.

35 Los datos de la Tabla 5 más adelante 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

45 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, esencialmente tal como se describe en la ref. [101]. La PCR propensa a errores se realizó en la secuencia del Anticuerpo 6, usando condiciones de mutación elevada (7,2 mutaciones por 1.000 bp) en el protocolo del fabricante (BD Bioscience), con el fin de crear una biblioteca de secuencias de variantes de 574D04 que contuvieran mutaciones puntuales aleatorias. Esta biblioteca se expresó en los ribosomas y se incubó con GM-CSFR α con etiqueta de purificación para permitir que ocurriera la unión. Las variantes capaces de unirse al GM-CSFR α con etiqueta de purificación se capturaron y se extrajeron por medio del uso de perlas paramagnéticas recubiertas con proteína G (Dynal). Las variantes no unidas que permanecían en la población se añadieron a un grupo de cuatro anticuerpos antiidiotipos biotinilados, que previamente se habían obtenido a partir de la gran biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos humanos descrita en la ref. [102] y se sabía que se unen al scFv del Anticuerpo 6. Las variantes unidas por los anticuerpos antiidiotípicos biotinilados se capturaron con perlas de estreptavidina, mientras que las variantes no unidas se retiraron por lavado. Este proceso se repitió durante dos rondas adicionales de selección de presentación en ribosomas, siguiendo la metodología general de la ref. [101].

60 Una proporción representativa de las variantes a partir de los resultados de la selección se clonó en un vector fagémido y las variantes del scFv se expresaron en fagos para el ensayo por ELISA, usando el mismo procedimiento que se describe por Edwards BM y col.(2003) Journal of Molecular Biology Vol 334:103. Las variantes que no presentaron unión al GM-CSFR α de purificación-etiquetada se examinaron para determinar la unión al grupo de cuatro anticuerpos antiidiotípicos que se usaron en la selección. Las variantes que, en el ensayo de unión antiidiotipo, 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.

65

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 del 5 % o superior.

Siete posiciones dentro de V_H CDR3 y V_L CDR3 del Anticuerpo 6 se destacaron como posiciones putativas importantes para la unión del antígeno usando el procedimiento de selección negativa de presentación en ribosomas. Se realizó un análisis después en 160 variantes de secuencia aisladas durante el proceso de optimización del anticuerpo 28G5, en el que las secuencias enteras de CDR3 de V_H y CDR3 de V_L se aleatorizaron y se seleccionaron por una mayor afinidad. Todas las secuencias (incluida 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.

Determinación del epítipo lineal

Se examinó el Anticuerpo 6 y el anticuerpo 2B7 conocido frente a 2442 péptidos, que representaba cada uno regiones cortas de secuencia de aminoácidos de la porción extracelular de GM-CSFR- α , usando un procedimiento PEPSCAN. Las señales de unión para cada anticuerpo frente a 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 superior se consideró como una señal específica positiva. Las secuencias de péptidos que dan señal específica positiva se analizaron para determinar 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 preferentemente 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 ID N°: 206.

Procedimiento PEPSCAN (exploración de péptido de unión)

Péptidos sintéticos de superposición en su mayor parte de 15-meros que tenían secuencias obtenidas a partir de GM-CSF se sintetizaron y examinaron usando mini tarjetas PEPSCAN de formato de tarjetas de crédito (placa de 455 pocillos con pocillos de 3 μ l) tal como se ha descrito previamente [103]. La unión de los anticuerpos a cada péptido se examinó 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 μ g/ml del anticuerpo o el suero diluido 1/1000 en una solución de PBS que contenía el 5 % de suero de caballo (v/v) y el 5 % de ovalbúmina (p/v)) y el 1 % de Tween 80 o en caso de bloqueo leve en una solución de PBS con el 4 % de suero de caballo (v/v) y el 1 % de Tween 80 (4 °C, durante la noche). Después del lavado, los péptidos se incubaron con un anticuerpo antiperoxidasa (dilución 1/1000, por ejemplo de conejo antiperoxidasa de ratón, Dako) (1 h, 25 °C), y posteriormente, después de lavar el sustrato de sulfonato de peroxidasa 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS), se añadieron 2 μ l/ml de H₂O₂ al 3 %. Después de 1 hora el desarrollo de color se midió. El desarrollo del color del ensayo 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 informático de procesamiento de imágenes Optimas, versión 6,5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, Estados Unidos). Optimas se ejecuta en un sistema informático pentium.

Métodos y materiales de ensayo

Ensayo bioquímico de unión al ligando

Las preparaciones de scFv purificadas se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 3 del documento W001/66754 [104]. Las concentraciones de proteína de las preparaciones de scFv purificados se determinaron usando el procedimiento BCA [105]. Las placas de microvaloración de 96 pocillos Fluoronunc™ se recubrieron durante la noche a 4 °C con 50 μ l/pocillo de una IgG4 antihumana diluida a 2,5 μ g/ml en PBS. Las placas se lavaron 3 veces con 300 μ l/pocillo de PBS/Tween-20 al 0,1 % antes de bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente con 300 μ l/pocillo de BSA al 3 % en PBS. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces con 300 μ l/pocillo de PBS/ Tween-20 al 0,1 % y después se añadieron 50 μ l de GM-CSFR α humano diluido a 62,5 ng/ml en BSA al 1 %/PBS a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces tal como se ha descrito anteriormente, se añadieron 25 μ l de material de muestra a cada pocillo y después 25 μ l de GM-CSF biotinilado diluido a 2 nM en BSA al 1 %/PBS. Para definir la unión total, sólo se usó el tampón como material de muestra. Para definir la unión no específica, GM-CSF no etiquetado diluido a 100 nM en BSA al 1 % se usó como material de muestra. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente antes de lavar 3 veces tal como se ha descrito anteriormente. Se añadieron 50 μ l de estreptavidina etiquetada con europio (PerkinElmer) diluida a 100 ng/ml en el tampón de ensayo DELFIA™ a cada pocillo de la placa y se incubó durante 30-60 minutos a temperatura ambiente antes de lavar 7 veces con el tampón de lavado DELFIA™. Se añadieron 50 μ l/pocillo de la

solución de potenciación DELFIA™ a las placas y las muestras se leyeron a 615 nm en un lector de placas.

Ensayo de proliferación de TF-1

- 5 Las células TF-1, obtenidas a partir de R&D Systems mantenidas rutinariamente en medio RPMI 1640, FBS al 10 %, piruvato sódico 1mM y GM-CSF 4 ng/ml, se privaron de nutrientes mediante 3 lavados en medio de ensayo (RPMI 1640, FBS al 5 %, piruvato sódico 1 mM), se resuspendieron en el medio de ensayo y se incubaron durante 7-24 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se resuspendieron después en 1x10⁵/ml en medio de ensayo y se añadieron 100 µl 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 diluirlas en el medio de ensayo. Se añadieron 50 µl del material de ensayo después a cada pocillo de células y éstas se incubaron durante 45-60 min a 37 °C en CO₂ al 5 %. Después se añadieron 50 µl de GM-CSF diluido al valor de la CE₈₀ en medio de ensayo (o 0,4 ng/ml para lotes de GM-CSF) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C en CO₂ al 5 % en una cámara humidificada. Esto representa una concentración final 7 pM de GM-CSF. Con el fin de medir la proliferación de las células, se añadieron 20 µl de ³H-timidina diluida a 5,0 µCi/ml en medio de ensayo a cada pocillo de la placa y las placas se incubaron durante 4 horas ± 30 min a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células después se cosecharon en placas de 96 pocillo GF/C Unifilter™ usando una cosechadora de placa y se lavaron. Después de la adición de 50 µl de MicroScint 20™ a cada pocillo de la placa de filtro, las placas se sellaron y se contaron en un lector de placas TopCount.

20

Ensayo de cambio de forma del granulocito humano

- La capa leucocitaria humana (bolsa de sangre humana del servicio de transfusión de sangre) se mezcló con un volumen igual de dextrano T-500 al 3 % en NaCl al 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 400 g durante 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 20 ml de agua helada durante 30 s seguido de la adición inmediata de cloruro de sodio al 1,8 % helado. Las células después se resedimentaron a 1200 rpm y se resuspendieron en medio de ensayo (RPMI1640, FBS al 10 %, 100 u/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomycin, HEPES 25 mM) a 1x10⁶/ml. Después se añadieron 100µl de células a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. Las muestras de ensayo se prepararon por filtración estéril y dilución de la muestra madre, según fuera apropiado, en medio de ensayo.

- 35 Para el aislamiento guiado, se añadieron después 50 µl de la muestra de ensayo a las células y las placas se incubaron durante 45- 60 min. a 37 °C en CO₂ al 5 %. Esto representa una concentración final 7 pM de GM-CSF. Después se realizó la adición de 50 µl de GM-CSF diluido a 0,4 ng/ml en medio de ensayo a cada placa y 4 horas de incubación a 37 °C en CO₂ al 5 % en una cámara humidificada.

- 40 Para la optimización guiada, las IgG4 filtradas, diluidas en medio de ensayo, se mezclaron con un volumen igual de GMCSF a 0,4 ng/ml en medio de ensayo. Esto representa una concentración final de GM-CSF de 7 pM. Después se añadieron 100µl de la mezcla anticuerpo/GM-CSF a cada pocillo. Después se siguió con 3 horas de incubación a 37 °C en CO₂ al 5 % en una cámara humidificada.

- 45 Se añadió formaldehído frío a una concentración final del 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 usando 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

- Se evaluaron anticuerpos 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 tal como se ha descrito para el ensayo de cambio de forma de los granulocitos humanos.

55

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

- Se usó el sistema BIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor) para evaluar los parámetros cinéticos de la interacción entre los scFv y las IgG4 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 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 se detecta cualquier unión en forma de 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 el ligando cualquier analito que queda y el procedimiento se repite con varias concentraciones de analitos diferentes. Se usa normalmente una serie de controles durante el experimento para asegurar que ni la capacidad de unión

65

absoluta ni el perfil cinético del ligando acoplado cambian de manera significativa. Se usa típicamente una propiedad del tampón salino HEPES (HBS-EP) 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 corresponden directamente con 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 informático 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 permiten después el cálculo de las constantes de afinidad de asociación y disociación.

10 La afinidad de la IgG4 se estimó usando 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, de 100 a 6,25 nM se pasaron después secuencialmente sobre la IgG4. La molaridad del receptor se calculó usando 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 analizó en formatos idénticos. Los datos corregidos de célula de referencia se ajustaron usando el modelo de Langmuir 1:1 fijado para el cálculo global simultáneo de las velocidades de asociación y disociación, con el valor de $R_{máx}$ 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.

25 Producción del dominio extracelular de GM-CSFR α de purificación-etiquetada: Un vector de expresión pEFBOS [106] que incorpora una secuencia que codifica el dominio extracelular del receptor α de GM-CSF humano (SEC ID N°: 205, que representa los aminoácidos 1 a 298 de GM-CSF R maduro) con una secuencia señal de IL-3 murina y que incorpora una etiqueta de purificación N terminal se usó para producir el polipéptido del dominio extracelular (ECD) del receptor GM-CSF recombinante etiquetado en el extremo N terminal. El polipéptido ECD etiquetado se expresó en células CHO usando el vector pEFBOS y usando procedimientos estándar. Este polipéptido también se puede denominar dominio extracelular de GM-CSFR α purificado, o dominio extracelular de GM-CSFR α soluble.

30 Se puede usar cualquier etiqueta de purificación adecuada, por ejemplo el péptido Flag (DYKDDDE - SEC ID N°: 204), el Fc, la biotina o su etiqueta. La purificación puede llevarse a cabo usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, un polipéptido ECD etiquetado con Flag (SEC ID N°: 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

40 Purificación de monocitos (kit de aislamiento de monocitos - Miltenyi Biotec - 130-053-301):

Las capas leucocitarias humanas (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, N° de cat. 1077-1) y las células se centrifugaron a 400 x g durante 40 minutos. No se aplicó freno cuando se detuvo la centrifugadora. Las células PBMC se cosecharon después desde la interfase. Las células se lavaron en PBS y se sedimentaron a 300 x g durante 10 min antes de que los glóbulos rojos restantes se lisaran por resuspensión en 20 ml de agua helada durante 15 s seguidos de la adición inmediata de NaCl al 1,8 % helado. Las células se sedimentaron después a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 600 μ l del tampón MACS (PBS, EDTA 2 mM). Se añadieron 200 μ l de reactivo de bloqueo de Fc proporcionado con el kit a las células y se mezcló antes de la adición de 200 μ l de cóctel hapteno-anticuerpo (proporcionado también con el kit) y se mezcló. Las células se incubaron después a 4 °C durante 15 min antes lavar dos veces con 50 ml del tampón MACS. El sedimento celular se resuspendió en 600 μ l del tampón 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 con 50 ml del tampón MACS y resuspensión en 500 μ l del tampón MACS. Se preparó una sola columna (Miltenyi Biotec 130-042-401) lavando completamente con 3 ml del tampón 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 2 x 3 ml del tampón MACS y el efluente se recogió. La pureza de los monocitos se comprobó mediante tinción con anti-CD14-PE usando procedimientos estándar de citometría de flujo. Las células se resuspendieron finalmente en 4 x 10⁶/ml en medio de ensayo (RPMI 1640, FCS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin).

60 Estimulación de monocitos:

Se añadieron 50 μ l de células a cada pocillo de una placa Costar de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 25 μ l de 150 μ g/ml de rhIFN γ (R&D systems) a todos los pocillos. Las IgG4 filtradas diluidas en medio de ensayo se mezclaron con un volumen igual de GM-CSF a 56 ng/ml (4 nM) en medio de ensayo. Esto representa una concentración final de GM-CSF 1 nM. Se añadieron después 75 μ l de la mezcla anticuerpo/GM-CSF 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 CO₂ al 5 % en una cámara humidificada. Después se recogió el sobrenadante para el ensayo de los niveles de TNF- α por ELISA.

- 5 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 100 μ l de anticuerpo de captura 4 μ g/ml en PBS. Las placas se lavaron después tres veces con PBS/Tween al 0,1 % y se bloquearon con 300 μ l/pocillo de Marvel al 3 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS/ Tween al 0,1 %. Se transfirieron 100 μ l del sobrenadante de las placas de ensayo a la placa de ELISA y se añadió a los pocillos de control una valoración 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/ Tween al 0,1 %. Se añadieron 100 μ l del anticuerpo de detección diluido a 300 ng/ml en Marvel al 1 %/PBS 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/ Tween al 0,1 %. La estreptavidina-europio (PerkinElmer 1244-360) se diluyó 1:1000 en el tampón de ensayo DELFIA (PerkinElmer 4002-0010) y se añadió a 100 μ l/pocillo antes de incubar durante 45 min. a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 7 veces en tampón de lavado DELFIA antes de la adición de 100 μ l/pocillo de solución potenciadora (PerkinElmer 4001-0010) y se leyeron a 615 nm en un lector de placas.

Ensayo de supervivencia de granulocitos

- 20 Las células se purificaron a partir de la capa leucocitaria humana tal como se describe para el ensayo de activación de neutrófilos (ensayo de cambio de forma), se lavaron en medio de ensayo (RPMI-1640 Glutamax, FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina) y se resuspendieron a 1 x 10⁶/ml en medio de ensayo. Se añadieron 100 μ l de células 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 y se mezclaron con un volumen igual de GM-CSF a 0,4 ng/ml. Esto representa una concentración final de GM-CSF 7 pM. Los pocillos de control contenían medio solo o GM-CSF solo. Después se añadieron 100 μ l de la mezcla muestra de prueba/GM-CSF a cada pocillo de la placa y las células se incubaron durante 68 horas a 37 °C/ CO₂ al 5 % en una cámara humidificada. Se añadieron 20 μ l de AlamarBlue a cada pocillo y las placas se incubaron durante otras 24 horas a 37 °C/ CO₂ al 5 % en una cámara humidificada. Las placas se leyeron después a 560 nm y 590 nm en un lector de placas.

Análisis de pA₂ 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

- 35 La herramienta farmacológica principal para cuantificar la afinidad de un antagonista competitivo es el análisis de Schild. Usando este enfoque se puede determinar un medio independiente del sistema de estimación de la afinidad de los antagonistas en un ensayo funcional. El procedimiento 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, se puede determinar la afinidad del antagonista. Este antagonismo se cuantifica mediante la medición de la relación de concentraciones equiactivas de agonistas, medida en presencia y ausencia del antagonista, denominadas relaciones de dosis (DR).

- Las relaciones de dosis se pueden calcular tomando la relación de la CE50 del agonista (típicamente GM-CSF) en ausencia del miembro de unión con respecto a la CE50 del agonista en presencia de una concentración única del miembro de unión. Las relaciones de dosis, expresadas como log(DR-1) se pueden usar después en una regresión lineal sobre log[miembro de unión] para producir una regresión de Schild. Así, para cada concentración de 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 competitivo, habrá una relación lineal entre log (DR-1) y log [miembro de unión] de acuerdo con la ecuación Schild en la que la ecuación es la siguiente

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

- En estas circunstancias, un valor de cero para la ordenada dará un intercepto del eje-x en el que 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.

- Debido a que los valores de K_A se obtuvieron a partir de una representación gráfica logarítmica, son una distribución logarítmica normal. El logaritmo negativo de esta concentración particular se denomina empíricamente pA₂, 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 pA₂ a partir de una única concentración de antagonista que produce un único valor para la relación de dosis a partir de la ecuación, en la que

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

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

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

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

- 10 *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 de donantes que se habían sometido a la movilización de células progenitoras y aféresis como parte de su gestión clínico estándar. Las muestras se deidentificaron y las células no se crioconservaron antes de su uso. Se cultivaron 5×10^4 células mononucleares en agar semisólido [107] en presencia de GM-CSF humano a una concentración final de 10 ng/ml. Para el ensayo de afinidad los mAb 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 o 0,05 $\mu\text{g/ml}$. El mAb parental humano 28G5 y un isotipo que se ajustaba al mAb humano de control negativo, CAT001, se evaluaron a una concentración única de 10 $\mu\text{g/ml}$. Para fines de control, los mAb se evaluaron además para determinar su capacidad de bloqueo de la formación de colonias estimulada por una combinación de SCF, IL-3 y G-CSF (Croker y col., 2004) y por su influencia 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 CO₂ al 10 % en aire. Las colonias se fijaron con glutaraldehído y se contaron usando un microscopio de disección con un aumento de 35 X.

25

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

Se generaron ratones transgénicos (Tg) que expresaban ambas cadenas de GM-CSFR humano α y β con el control de un promotor de MHC clase I 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 mAb específico del huGMCSFR α , se puede usar el trasplante de médula ósea de los ratones Tg en los ratones de tipo silvestre para generar animales quiméricos de forma que la expresión del huGM-CSFR $\alpha\beta$ transgénico esté limitada a las células hematopoyéticas obtenidas de médula ósea y, de este modo, se asemeje más al perfil de expresión del receptor endógeno. En estos ratones quiméricos Tg huGMCSFR $\alpha\beta$ la administración de huGM-CSF conduce a un aumento del peso del bazo y la marginación de los monocitos circulantes en sangre.

35

Generación de ratones quiméricos Tg:

los fémures y tibias de los ratones Tg donantes se retiraron y la médula ósea se enjuagó con PBS estéril más suero de ternero fetal al 3 %). Los tapones de médula ósea se extrajeron después mediante 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 pasaron a través de una malla de acero inoxidable. Después, se retiraron los glóbulos rojos mediante lisis en tampón de cloruro de amonio 0,168 M, después de lo cual las células se lavaron dos veces más con solución salina regulada con fosfato (PBS) + FCS al 3 % antes de pasarlas de nuevo a través de una malla de acero inoxidable. Para eliminar adicionalmente 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 $2,5 \times 10^7/\text{ml}$. Los ratones C57/BL6 receptores de 5 a 8 semanas de edad se irradiaron letalmente con 2 dosis de 550 Rad, con 3 horas de diferencia. A los ratones receptores se les inyectó por vía intravenosa (i.v) 0,2 ml de la suspensión de células (es decir, 5×10^6 células/ratón) y posteriormente se alojaron en cajas tapadas 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 usando mAb específicos para las cadenas α y β del huGMCSFR.

50

Tratamiento de GM-CSF y el posterior análisis de los ratones quiméricos Tg:

Se trataron ratones quiméricos Tg dos veces diariamente por vía subcutánea (s.c) con 500 ng de huGM-CSF durante 4 días. Para el análisis de la actividad antagonista de los anticuerpos, se administró a grupos de 5 ratones las dosis seleccionadas del mAb (ver más adelante) por vía intraperitoneal (ip) 1 día antes de la iniciación del tratamiento de GM-CSF. El día 5, se tomaron muestras de 0,2 ml de sangre para el análisis de poblaciones de leucocitos circulantes, particularmente monocitos sanguíneos, usando el sistema de hematología ADVIA™ (Bayer Diagnostics). Después, los animales se sacrificaron y los bazos se retiraron para la medición del peso.

60

Inhibición del TNF α y la IL-6 humanos expresados endógenamente de células mononucleares de sangre periférica humana. Las capas leucocitarias humanas (bolsa de sangre humana del servicio de transfusión de sangre) se dispusieron en capas en la parte superior de un gradiente de densidad histopaque 1.077 (Sigma, N° de cat. 1077-1) y las células se centrifugaron a 400 x g durante 40 minutos. No se aplicó el freno cuando se detuvo la

65

centrifugadora. Después se recogieron las células PBMC de la interfase. Las células se lavaron en PBS y se sedimentaron a 300 x g durante 10 min antes de que los glóbulos rojos restantes se lisaran por resuspensión en 20 ml de agua helada durante 15 s seguido de la adición inmediata de NaCl al 1,6 % helado. Las células se sedimentaron después a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 10 ml de FBS/RPMI al 10 % y penicilina estreptomicina al 1 %. Las células se diluyeron después a 5×10^6 /ml. Se dispensaron 110 μ l de células por pocillo ($5,5 \times 10^5$ /pocillo) y las células se dejaron sedimentar durante 1 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se añadieron los siguientes reactivos como controles de concentraciones finales individuales; PHA (5 μ g/ml), LPS (25 μ g/ml), GM-CSF (10 ng/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 se incubaron después durante 72 h a 37 °C, CO₂ al 5 %. Los sobrenadantes se recogieron después de 72 h y se calcularon los niveles de TNFa e IL-6 usando 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.

15 *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 valorada y se calcularon los valores de CI50 para los anticuerpos. Los datos son representativos de $n \geq 3$. Se muestra el SEM (error típico de la media).*

IgG4	CI50 \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
anticuerpo 8	34,5 \pm 2,63
anticuerpo 9	40,8 \pm 7,15
anticuerpo 10	55,3 \pm 3,73
anticuerpo 11	9,0 \pm 1,0
anticuerpo 12	246,3 \pm 19,8
anticuerpo 13	1106,0 \pm 174,9
anticuerpo 14	16,3 \pm 4,9
anticuerpo 15	163,8 \pm 7,3
anticuerpo 16	12,8 \pm 3,3
anticuerpo 17	14,3 \pm 2,8
anticuerpo 18	13,3 \pm 3,4
anticuerpo 19	23,8 \pm 4,3
anticuerpo 20	9,8 \pm 2,8

20 *Tabla 2: Análisis cinético de los anticuerpos IgG4 anti-GM-CSFR α que no se transformaron 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 con etiqueta de purificación se pasaron sobre la IgG4. Los datos se ajustaron por medio del uso de k_a kd 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

IgG4	KD (nM)
anticuerpo 6	0,139
anticuerpo 7	3,93
anticuerpo 8	0,552
anticuerpo 10	1,50
IgG4	KD (nM)
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 CI50 para los anticuerpos.*

IgG4	CI50 ± DT (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 $TNP\alpha$ 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 $TNF\alpha$ se midió mediante ELISA y se calcularon los valores de IC50 para los anticuerpos.*

IgG4	CI50 ± DT (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

- 1 Anticuerpo 01: VH nt
- 2 Anticuerpo 01: VH aa
- 5 3 Anticuerpo 01: CDR1 de VH aa
- 4 Anticuerpo 01: CDR2 de VH aa
- 5 Anticuerpo 01: CDR3 de VH aa
- 10 6 Anticuerpo 01: VL nt
- 7 Anticuerpo 01: VL aa
- 15 8 Anticuerpo 01: CDR1 de VL aa
- 9 Anticuerpo 01: CDR2 de VL aa
- 10 Anticuerpo 01: CDR3 de VL aa
- 20 11 Anticuerpo 02: VH nt
- 12 Anticuerpo 02: VH aa
- 25 13 Anticuerpo 02: CDR1 de VH aa
- 14 Anticuerpo 02: CDR2 de VH aa
- 15 Anticuerpo 02: CDR3 de VH aa
- 30 16 Anticuerpo 02: VL nt
- 17 Anticuerpo 02: VL aa
- 35 18 Anticuerpo 02: CDR1 de VL aa
- 19 Anticuerpo 02: CDR2 de VL aa
- 20 Anticuerpo 02: CDR3 de VL aa
- 40 21 Anticuerpo 03: VH nt
- 22 Anticuerpo 03: VH aa
- 45 23 Anticuerpo 03: CDR1 de VH aa
- 24 Anticuerpo 03: CDR2 de VH aa
- 25 Anticuerpo 03: CDR3 de VH aa
- 50 26 Anticuerpo 03: VL nt
- 27 Anticuerpo 03: VL aa
- 55 28 Anticuerpo 03: CDR1 de VL aa
- 29 Anticuerpo 03: CDR2 de VL aa
- 30 Anticuerpo 03: CDR3 de VL aa
- 60 31 Anticuerpo 04: VH nt
- 32 Anticuerpo 04: VH aa
- 65 33 Anticuerpo 04: CDR1 de VH aa

34 Anticuerpo 04: CDR2 de VH aa
35 Anticuerpo 04: CDR3 de VH aa
5 36 Anticuerpo 04: VL nt
37 Anticuerpo 04: VL aa
38 Anticuerpo 04: CDR1 de VL aa
10 39 Anticuerpo 04: CDR2 de VL aa
40 Anticuerpo 04: CDR3 de VL aa
15 41 Anticuerpo 05: VH nt
42 Anticuerpo 05: VH aa
43 Anticuerpo 05: CDR1 de VH aa
20 44 Anticuerpo 05: CDR2 de VH aa
45 Anticuerpo 05: CDR3 de VH aa
25 46 Anticuerpo 05: VL nt
47 Anticuerpo 05: VL aa
48 Anticuerpo 05: CDR1 de VL aa
30 49 Anticuerpo 05: CDR2 de VL aa
50 Anticuerpo 05: CDR3 de VL aa
35 51 Anticuerpo 06: VH nt
52 Anticuerpo 06: VH aa
53 Anticuerpo 06: CDR1 de VH aa
40 54 Anticuerpo 06: CDR2 de VH aa
55 Anticuerpo 06: CDR3 de VH aa
45 56 Anticuerpo 06: VL nt
57 Anticuerpo 06: VL aa
58 Anticuerpo 06: CDR1 de VL aa
50 59 Anticuerpo 06: CDR2 de VL aa
60 Anticuerpo 06: CDR3 de VL aa
55 61 Anticuerpo 07: VH nt
62 Anticuerpo 07: VH aa
63 Anticuerpo 07: CDR1 de VH aa
60 64 Anticuerpo 07: CDR2 de VH aa
65 Anticuerpo 07: CDR3 de VH aa
65 66 Anticuerpo 07: VL nt

67 Anticuerpo 07: VL aa
68 Anticuerpo 07: CDR1 de VL aa
5 69 Anticuerpo 07: CDR2 de VL aa
70 Anticuerpo 07: CDR3 de VL aa
71 Anticuerpo 08: VH nt
10 72 Anticuerpo 08: VH aa
73 Anticuerpo 08: CDR1 de VH aa
15 74 Anticuerpo 08: CDR2 de VH aa
75 Anticuerpo 08: CDR3 de VH aa
76 Anticuerpo 08: VL nt
20 77 Anticuerpo 08: VL aa
78 Anticuerpo 08: CDR1 de VL aa
25 79 Anticuerpo 08: CDR2 de VL aa
80 Anticuerpo 08: CDR3 de VL aa
81 Anticuerpo 09: VH nt
30 82 Anticuerpo 09: VH aa
83 Anticuerpo 09: CDR1 de VH aa
35 84 Anticuerpo 09: CDR2 de VH aa
85 Anticuerpo 09: CDR3 de VH aa
86 Anticuerpo 09: VL nt
40 87 Anticuerpo 09: VL aa
88 Anticuerpo 09: CDR1 de VL aa
45 89 Anticuerpo 09: CDR2 de VL aa
90 Anticuerpo 09: CDR3 de VL aa
91 Anticuerpo 10: VH nt
50 92 Anticuerpo 10: VH aa
93 Anticuerpo 10: CDR1 de VH aa
55 94 Anticuerpo 10: CDR2 de VH aa
95 Anticuerpo 10: CDR3 de VH aa
96 Anticuerpo 10: VL nt
60 97 Anticuerpo 10: VL aa
98 Anticuerpo 10: CDR1 de VL aa
65 99 Anticuerpo 10: CDR2 de VL aa

100 Anticuerpo 10: CDR3 de VL aa
101 Anticuerpo 11: VH nt
5 102 Anticuerpo 11: VH aa
103 Anticuerpo 11: CDR1 de VH aa
104 Anticuerpo 11: CDR2 de VH aa
10 105 Anticuerpo 11: CDR3 de VH aa
106 Anticuerpo 11: VL nt
15 107 Anticuerpo 11: VL aa
108 Anticuerpo 11: CDR1 de VL aa
109 Anticuerpo 11: CDR2 de VL aa
20 110 Anticuerpo 11: CDR3 de VL aa
111 Anticuerpo 12: VH nt
25 112 Anticuerpo 12: VH aa
113 Anticuerpo 12: CDR1 de VH aa
114 Anticuerpo 12: CDR2 de VH aa
30 115 Anticuerpo 12: CDR3 de VH aa
116 Anticuerpo 12: VL nt
35 117 Anticuerpo 12: VL aa
118 Anticuerpo 12: CDR1 de VL aa
119 Anticuerpo 12: CDR2 de VL aa
40 120 Anticuerpo 12: CDR3 de VL aa
121 Anticuerpo 13: VH nt
45 122 Anticuerpo 13: VH aa
123 Anticuerpo 13: CDR1 de VH aa
124 Anticuerpo 13: CDR2 de VH aa
50 125 Anticuerpo 13: CDR3 de VH aa
126 Anticuerpo 13: VL nt
55 127 Anticuerpo 13: VL aa
128 Anticuerpo 13: CDR1 de VL aa
129 Anticuerpo 13: CDR2 de VL aa
60 130 Anticuerpo 13: CDR3 de VL aa
131 Anticuerpo 14: VH nt
65 132 Anticuerpo 14: VH aa

133 Anticuerpo 14: CDR1 de VH aa
134 Anticuerpo 14: CDR2 de VH aa
5 135 Anticuerpo 14: CDR3 de VH aa
136 Anticuerpo 14: VL nt
137 Anticuerpo 14: VL aa
10 138 Anticuerpo 14: CDR1 de VL aa
139 Anticuerpo 14: CDR2 de VL aa
15 140 Anticuerpo 14: CDR3 de VL aa
141 Anticuerpo 15: VH nt
142 Anticuerpo 15: VH aa
20 143 Anticuerpo 15: CDR1 de VH aa
144 Anticuerpo 15: CDR2 de VH aa
25 145 Anticuerpo 15: CDR3 de VH aa
146 Anticuerpo 15: VL nt
147 Anticuerpo 15: VL aa
30 148 Anticuerpo 15: CDR1 de VL aa
149 Anticuerpo 15: CDR2 de VL aa
35 150 Anticuerpo 15: CDR3 de VL aa
151 Anticuerpo 16: VH nt
152 Anticuerpo 16: VH aa
40 153 Anticuerpo 16: CDR1 de VH aa
154 Anticuerpo 16: CDR2 de VH aa
45 155 Anticuerpo 16: CDR3 de VH aa
156 Anticuerpo 16: VL nt
157 Anticuerpo 16: VL aa
50 158 Anticuerpo 16: CDR1 de VL aa
159 Anticuerpo 16: CDR2 de VL aa
55 160 Anticuerpo 16: CDR3 de VL aa
161 Anticuerpo 17: VH nt
162 Anticuerpo 17: VH aa
60 163 Anticuerpo 17: CDR1 de VH aa
164 Anticuerpo 17: CDR2 de VH aa
65 165 Anticuerpo 17: CDR3 de VH aa

- 166 Anticuerpo 17: VL nt
- 167 Anticuerpo 17: VL aa
- 5 168 Anticuerpo 17: CDR1 de VL aa
- 169 Anticuerpo 17: CDR2 de VL aa
- 170 Anticuerpo 17: CDR3 de VL aa
- 10 171 Anticuerpo 18: VH nt
- 172 Anticuerpo 18: VH aa
- 15 173 Anticuerpo 18: CDR1 de VH aa
- 174 Anticuerpo 18: CDR2 de VH aa
- 175 Anticuerpo 18: CDR3 de VH aa
- 20 176 Anticuerpo 18: VL nt
- 177 Anticuerpo 18: VL aa
- 25 178 Anticuerpo 18: CDR1 de VL aa
- 179 Anticuerpo 18: CDR2 de VL aa
- 180 Anticuerpo 18: CDR3 de VL aa
- 30 181 Anticuerpo 19: VH nt
- 182 Anticuerpo 19: VH aa
- 35 183 Anticuerpo 19: CDR1 de VH aa
- 184 Anticuerpo 19: CDR2 de VH aa
- 185 Anticuerpo 19: CDR3 de VH aa
- 40 186 Anticuerpo 19: VL nt
- 187 Anticuerpo 19: VL aa
- 45 188 Anticuerpo 19: CDR1 de VL aa
- 189 Anticuerpo 19: CDR2 de VL aa
- 190 Anticuerpo 19: CDR3 de VL aa
- 50 191 Anticuerpo 20: VH nt
- 192 Anticuerpo 20: VH aa
- 55 193 Anticuerpo 20: CDR1 de VH aa
- 194 Anticuerpo 20: CDR2 de VH aa
- 195 Anticuerpo 20: CDR3 de VH aa
- 60 196 Anticuerpo 20: VL nt
- 197 Anticuerpo 20: VL aa
- 65 198 Anticuerpo 20: CDR1 de VL aa

ES 2 424 468 T3

	199	Anticuerpo 20: CDR2 de VL aa
	200	Anticuerpo 20: CDR3 de VL aa
5	201	Secuencia del residuo de GM-CSFR α lineal
	202	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de GM-CSFR α humano
	203	Dominio extracelular de GM-CSFR α humano marcado con FLAG
10	204	Péptido FLAG
	205	Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de GM-CSFR α humano
15	206	GM-CSFR α maduro
	207	Anticuerpo 1: VL nt
	208	Anticuerpo 1: VL aa
20	209	Anticuerpo 2: VL nt
	210	Anticuerpo 2: VL aa
25	211	Anticuerpo 3: VL nt
	212	Anticuerpo 3: VL aa
	213	Anticuerpo 4: VL nt
30	214	Anticuerpo 4: VL aa
	215	Anticuerpo 5: VL nt
35	216	Anticuerpo 5: VL aa
	217	Anticuerpo 6: VL nt
	218	Anticuerpo 6: VL aa
40	219	Anticuerpo 7: VL nt
	220	Anticuerpo 7: VL aa
45	221	Anticuerpo 8: VL nt
	222	Anticuerpo 8: VL aa
	223	Anticuerpo 9: VL nt
50	224	Anticuerpo 9: VL aa
	225	Anticuerpo 10: VL nt
55	226	Anticuerpo 10: VL aa
	227	Anticuerpo 11: VL nt
	228	Anticuerpo 11: VL aa
60	229	Anticuerpo 12: VL nt
	230	Anticuerpo 12: VL aa
65	231	Anticuerpo 13: VL nt

- 232 Anticuerpo 13: VL aa
- 5 233 Anticuerpo 14: VL nt
- 234 Anticuerpo 14: VL aa
- 235 Anticuerpo 15: VL nt
- 10 236 Anticuerpo 15: VL aa
- 237 Anticuerpo 16: VL nt
- 238 Anticuerpo 16: VL aa
- 15 239 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
- 25 244 Anticuerpo 19: VL aa
- 245 Anticuerpo 20: VL nt
- 30 246 Anticuerpo 20: VL aa
- 247 Anticuerpo 6: VH nt
- 248 Anticuerpo 6: VH aa
- 35 249 Anticuerpo 6: VL nt
- 250 Anticuerpo 6: VL aa
- 40 251 FR1 de VH aa
- 252 FR2 de VH aa
- 253 FR3 de VH aa
- 45 254 FR4 de VH aa
- 255 FR1 de VL aa
- 50 256 FR2 de VL aa
- 257 FR3 de VL aa
- 258 FR4 de VL aa
- 55

Las secuencias de nucleótidos del dominio VL de los anticuerpos 1 a 20 no incluyen el codón gcg mostrado en el extremo 3' en las SEC ID N°: 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 ID N°: 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.

60

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

65

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 ajusta mediante 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 ajustan conjuntamente. La traducción de los ARN empalmados produce un polipéptido que comprende el dominio VL y el CL. Después del ajuste, la Gly de la posición 112 está codificada por la última base (g) de la secuencia del marco estructural 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 ID N°: 186 a 246 tal 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 secuencias correspondientes de aminoácidos del dominio VL.

Las secuencias de los dominios VH y VL no transformados a la línea germinal del Anticuerpo 6 se muestran en las SEC ID N°: 247 - 250, además de las secuencias de los dominios VH y VL transformados a la línea germinal que se muestran en las SEC ID N°: 51, 52, 56, 57, 216 y 217.

Referencias

1. Haman y col., 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) p 1724-31 (1993)
3. Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991)
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
8. Ausubel y col. eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4ª edición 1999
9. Wold, y col., 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 col., Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3ra edición (Abril 1998) ISBN: 0471170828
11. Kandel, Abraham y 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. y Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (Octubre 11, 1999), ISBN: 1558605525
14. Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K.
15. Ghose, Arup K. y 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 col., Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817
17. Al-Lazikani, y col., Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948
18. Chothia, y col., 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*, 2ª Edición, (Wiley) 1995.
- 5 22. Marks y col., *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.
- 10 24. Stemmer, *Nature*, 1994, 370:389-391
25. Gram y col., 1992, *Proc. Natl Acad. Sci., Estados Unidos*, 89:3576-3580
- 15 26. Barbas y col., 1994, *Proc. Natl Acad. Sci., Estados Unidos*, 91:3809-3813
27. Schier y col., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567
28. Ledermann J.A. y col., (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664
- 20 29. Bagshawe K.D. y col., (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
- 25 31. Ritz, S. A., M. J. Cundall, y col. (2002). *Am J Respir Cell Mol Biol* 27(4): 428-35.
32. Ritz, S. A., M. R. Stampfli, y col. (2002). *Trends Immunol* 23 (8) : 396-402.
- 30 33. WOOLLEY, K.L., y col. (1995). *Am J Respir Crit Care Med*, 151, 1915-24.
34. Kotsimbos, A. T., M. Humbert, y col. (1997). *J Allergy Clin Immunol* 99(5): 666-72.
35. Yamashita N. y col., *Cell. Immunol* 2002 oct; 219(2); 92-97
- 35 36. Ohta K., y col. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov; 104(5): 1024-30
37. Stampfli, M. R., R. E. Wiley, y col. (1998). *J Clin Invest* 102(9): 1704-14.
38. Cates, E. C., B. U. Gajewska, y col. (2003). *J Allergy Clin Immunol* 111 (5) : 1076-86.
- 40 39. CAMPBELL, I.K., y col. (1997) *Annal Res Dis*, 56, 364-368.
40. BISCHOF, R.J., D. ZAFIROPOULOS, J.A. HAMILTON AND I.K. CAMPBELL (2000) *Clin Exp Immunol*, 119, 361-367.
- 45 41. Campbell, I. K., M. J. Rich, y col. (1998). *J Immunol* 161(7): 3639-44.
42. Hamilton, J. A. (2002). *Trends Immunol* 23(8): 403-8.
- 50 43. YANG, Y.H. AND J.A. HAMILTON (2001) *Arthritis Rheumatol*, 44, 111-119
44. Cook, A. D., E. L. Braine, y col. (2001). *Arthritis Res* 3 (5) : 293-8.
45. Field, M. y L. Clinton (1993). *The Lancet* 342: 1244.
- 55 46. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. 1990 *J. Immunol*, mayo 1; 144(9): 3347-53
47. Leizer T, y col. 1990 *Blood* 1990 Nov. 15; 76(10): 1989-96
- 60 48. Fiehn C, y col., *Z Rheumatol* 1992 May-Jun; 51 (3): 1221-126
49. de Vries, E.G., y col. (1991) *Lancet*, 338, 517-518.
50. Hazenberg BP, y col., *Blood* 1989 Dic.; 74(8): 2769-70
- 65 51. Barnes y Hansel (2004). *Lancet*, 364:985-96.

52. Barnes, P.J. (2000). *Chest*, 117:10S-14S
53. McManus, T. E., y col. (2005) American Thoracic Society Meeting, May 2005.
54. Vlahos, R., y col. (2005). "GM-CSF is a key pathogenic mediator in experimental COPD." European Respiratory Society Meeting, Sept. 2005
55. McQualter JL, y col., (2001) *J Exp Med*. 194: 873-82
56. Bagby GC Jr, y col., 1998 *J. Clin Invest*. 4: 1430-6.
57. Estrov Z, y col., (1986) *Cancer Res*. 46: 6456-61.
58. Barak Y, y col., 1981 *Am J Hematol*. 10: 269-75.
59. Gualtieri RJ, y col., 1988 *Exp Hematol*. 16:613-9.
60. Suda T, y col., 1982 *Leuk Res*. 6: 43-53.
61. Gualtieri RJ, y col., 1989 *Blood*. 74: 2360-7
62. Largaespada DA, y col., (1996) *Nat. Genet*. 12: 137-43
63. Iversen, P. O., y col., (1997). *Blood* 90(12): 4910-7.
64. Wang y col., 1994 *Exp mol Pathol*
65. Plenz y col., *Art. Thrombosis and Vascular biology* 1997
66. Takashi y col., 1996 *Circulation* 93, 1185-1193
67. Biwa T y col., *JBC* 1998 273: 28305-28313
68. Makheja y col., *Atherosclerosis* 1989, 76 155-661
69. Naito y col., 1992 *J Nutri sci Vitamin* 38: 255-264
70. Hayashi y col., *Atherosclerosis* 1991 91: 107-116
71. Villa y col., 1994 *J Clin Invest* 93: 1243
72. Van Put DJ y col., 1995 *Eur J Pharmacol* 294: 753-761
73. Voisard y col., 1994 *Int J Cardiol* 43: 257-267
74. Yamada y col., 1993: *Artery* 20: 253-267
75. Sakai y col., 1999 *Arterioscler Thromb vasc biol* 19: 1726-1733
76. Gearing, y col. *EMBO J*. 8 (12): 3667-3676 (1989)
77. Crosier, K. y col. *PNAS* 88:7744-7748 1991
78. ravines, M. y col. *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 col., (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
82. Nygren y col., (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469
83. Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545

84. Mendez, M. y col., (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156
85. Knappik y col. *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86
- 5 86. Krebs y col., *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67-84
87. Ward, E.S. y col., *Nature* 341, 544-546 (1989)
88. McCafferty y col. (1990) *Nature*, 348, 552-554
- 10 89. Holt y col. (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
90. Bird y col., *Science*, 242, 423-426, 1988;
- 15 91. Huston y col., *PNAS Estados Unidos*, 85, 5879-5883, 1988
92. Holliger, P. y col., *Proc. Natl Acad Sci., Estados Unidos* 90 6444-6448, 1993
93. Reiter, Y. y col., *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996
- 20 94. Hu, S. y col., *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996.
95. Holliger, P. y Winter G. *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-449 1993
- 25 96. Ridgeway, J. B. B. y col., *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996
97. *Ann N Y Acad Sci.* 1971 Dic. 31;190:382-93.
- 30 98. Kabat, E.A. y col., *Secuencias of Proteins of Immunological Interest.* 4ta Edición. US Department of Health and Human Services. 1987
99. Kabat, E.A. y col., (1991) *Secuencias of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington.
- 35 100. Persic y col., 1997 *Gene* 187; 9-18
101. Hanes J y col., (2000) *Methods in Enzymology*, Vol 328:24.
102. Vaughan TJ y col., (1996) *Nature Biotechnology* Vol 14:309
- 40 103. Sloopstra-JW; Puijk-WC; Ligtoet-GJ; Langeveld-JP; Meloen-RH (1996). *Mol-Divers.* 1: 87-96
104. Documento W001/66754 C ambridge Antibody Technology Limited; Vaughan; Wilton; Smith; Main
- 45 105. P.K. Smith, y col., *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.
- 50 108. Nishijima, I., T. Nakahata, y col. (1997). *Blood* 90(3): 1031-8.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MedImmune Limited

5 <110> Zenyth Operations Pty Ltd

<120> MIEMBRO DE UNIÓN PARA EL RECEPTOR GM-CSF

<130> HMK/FP6767412

10 <140> EP

<141> 27/03/2007

15 <150> EP 07712963.3

<151> 27/03/2007

<150> PCT/GB2007/001108

20 <151> 27/03/2007

<150> US 60/786569

25 <151> 27/03/2007

<160> 258

<170> Cambridge Antibody Technology patent software version 1.0

30 <210> 1

<211> 360

35 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

40 <223> Ab1

<400> 1

cagggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggct 60

tcatgtaaag tttccggata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct 120

cccggaaaag gacttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctacaga cacggcctac 240

atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300

45 tctttcagtg gcatcgccta tcgcccctgg ggccaagggg caatgggtcac cgtctcctca 360

<210> 2

<211> 120

ES 2 424 468 T3

<210> 4
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <220>
 <223> Ab1
 <400> 4
 15 Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15

 Gly
 <210> 5
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <223> Ab1
 30 <400> 5
 Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro
 5 10

 <210> 6
 35 <211> 339
 <212> ADN
 40 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab1
 45 <400> 6
 cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

 cttccaggaa cagccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180

 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

ES 2 424 468 T3

<400> 8
 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10

5 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <220>

15 <223> Ab1
 <400> 9
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 20
 5
 <210> 10

25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <223> Ab1

35 <400> 10
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Ser Ile Ser Thr Ile
 5 10

40 <210> 11
 <211> 360
 <212> ADN

45 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab2

50 <400> 11
 caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
 cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

ES 2 424 468 T3

gcacagaggt tccagggcag agtcacccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300

tctttcagtg gccccgcct gcgcccctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 12

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Ab2

15 <400> 12

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

20

<210> 13

<211> 5

25

<212> PRT

ES 2 424 468 T3

<213> Homo sapiens
<220>
5 <223> Ab2
<400> 13
Glu Leu Ser Ile His
10 5
<210> 14
<211> 17
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <220>
<223> Ab2
<400> 14
25 Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
Gly
<210> 15
30 <211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35 <220>
<223> Ab2
40 <400> 15
Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro
5 10
<210> 16
45 <211> 339
<212> ADN
50 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab2
55 <400> 16
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

ES 2 424 468 T3

<211> 14
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<220>
10 <223> Ab2
<400> 18
Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10
15 <210> 19
<211> 7
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <223> Ab2
<400> 19
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
30 5
<210> 20
<211> 11
35 <212> PRT
<213> Homo sapiens
40 <220>
<223> Ab2
<400> 20
45 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10
<210> 21
50 <211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens
55 <220>
<223> Ab3
60 <400> 21

ES 2 424 468 T3

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> 23

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab3

15 <400> 23

Glu Leu Ser Ile His
5

<210> 24

20 <211> 17

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab3

30 <400> 24

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

Gly

35 <210> 25

<211> 11

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<220>

ES 2 424 468 T3

<223> Ab3
 <400> 25
 5 Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 26
 10 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> Ab3
 20 <400> 26
 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 gagtggttcg 300
 gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 27
 25 <211> 113
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab3
 35 <400> 27
 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

ES 2 424 468 T3

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> 28

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Ab3

15 <400> 28

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

<210> 29

20

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<220>

<223> Ab3

30

<400> 29

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

35 <210> 30

<211> 11

<212> PRT

ES 2 424 468 T3

<213> Homo sapiens
 <220>
 5 <223> Ab3
 <400> 30
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 10 5 10
 <210> 31
 <211> 360
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <223> Ab4
 <400> 31
 25 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 attattgtgc aatagtgggg 300
 tctttcagtc ccccgaccta cgggtactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 32
 30 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> Ab4
 40 <400> 32
 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

ES 2 424 468 T3

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

- 5 <210> 33
- <211> 5
- <212> PRT
- 10 <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Ab4
- 15 <400> 33
- Glu Leu Ser Ile His
- 5
- 20 <210> 34
- <211> 17
- <212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
- <220>
- 30 <223> Ab4
- <400> 34

ES 2 424 468 T3

<223> Ab4

<400> 37

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 Gly
100 105 110

Ala

<210> 38

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> Ab4

20 <400> 38

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

<210> 39

25 <211> 7

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

ES 2 424 468 T3

<213> Homo sapiens

<220>

5

<223> Ab5

<400> 42

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

10

<210> 43

<211> 5

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> Ab5

<400> 43

25

Glu Leu Ser Ile His
 5

<210> 44

ES 2 424 468 T3

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

10

<400> 44

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

5

10

15

Gly

15 <210> 45

<211> 11

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<220>

25 <223> Alb5

<400> 45

Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro

5

10

30

<210> 46

<211> 339

35 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

40

<223> Ab5

<400> 46

ES 2 424 468 T3

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 acagcagcct gagggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 47

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab5

15 <400> 47

ES 2 424 468 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

<210> 48

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab5

15 <400> 48

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

<210> 49

20 <211> 7

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab5

30

ES 2 424 468 T3

<400> 49

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

5 <210> 50

<211> 11

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<220>

15 <223> Ab5

<400> 50

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val

5

10

20

<210> 51

<211> 360

25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

30

<223> Ab6

<400> 51

cagggtccagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcatgtaaag tttccggata caccctcact gaactgtcca tccactgggt gcgacaggct 120

cccgaaaag gacttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacggcctac 240

atggaactga gcagcctgag atccgaggac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300

35 tctttcagtc ccttgacctt gggcctctgg ggccaagggg caatgggtcac cgtctcctca 360

<210> 52

<211> 120

40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <220>

ES 2 424 468 T3

<223> Ab6

<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

5 115 120

<210> 53

<211> 5

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<220>

<223> Ab6

<400> 53

20

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 54

25

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 424 468 T3

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab6

10

<400> 57

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

20

<213> Homo sapiens

<220>

25 <223> Ab6

<400> 58

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

30

ES 2 424 468 T3

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 64

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab7

15 <400> 64

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

5

10

15

Gly

<210> 65

20 <211> 11

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab7

30 <400> 65

Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu

5

10

35 <210> 66

<211> 339

<212> ADN

40 <213> Homo sapiens

<220>

45 <223> Ab7

<400> 66

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

50

ES 2 424 468 T3

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 67

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab7

15 <400> 67

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

20 <210> 68

<211> 14

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 424 468 T3

cccacaaaag gatttgagt gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300

tctttcagtc ccccgcccta ccgcccctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 72

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab8

15 <400> 72

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

20 <210> 73

<211> 5

ES 2 424 468 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <220>
<223> Ab8
10 <400> 73
Glu Leu Ser Ile His
5
<210> 74
15 <211> 17
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab8
25 <400> 74
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
Gly
30 <210> 75
<211> 11
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens
<220>
40 <223> Ab8
<400> 75
Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro
5 10
45 <210> 76
<211> 339
50 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
55 <223> Ab8
<400> 76

ES 2 424 468 T3

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

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab8

15 <400> 78

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

<210> 79

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab8

30 <400> 79

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

35 <210> 80

<211> 11

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<220>

45 <223> Ab8

ES 2 424 468 T3

<400> 80
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 5 10
 5 <210> 81
 <211> 360
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <223> Ab9
 <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 acggccgttt attattgtgc aatagtgggg 300
 20 tctttcagtc cggtcacgta cggcctctgg ggccaagga caatggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 82
 <211> 120
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <223> Ab9
 <400> 82
 35 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

ES 2 424 468 T3

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

<210> 83

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab9

15 <400> 83

Glu Leu Ser Ile His
5

<210> 84

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab9

30 <400> 84

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

Gly

35 <210> 85

<211> 11

ES 2 424 468 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <223> Ab9
 <400> 85
 10 Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
 5 10
 <210> 86
 15 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <223> Ab9
 25 <400> 86
 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 gagtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339
 30 <210> 87
 <211> 113
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab9
 40 <400> 87

ES 2 424 468 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> 88
- <211> 14
- <212> PRT
- 10 <213> Homo sapiens
- <220>
- 15 <223> Ab9
- <400> 88

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

- 20 <210> 89
- <211> 7
- 25 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 30 <223> Ab9

ES 2 424 468 T3

<400> 89
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 <210> 90
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <223> Ab9
 <400> 90
 Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 20 5 10
 <210> 91
 <211> 360
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 30 <223> Ab10
 <400> 91
 35 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
 tctttcagtg gcctcgcgta caggccctgg ggcaaagga caatggtcac catctcgagt 360
 <210> 92
 40 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <220>

ES 2 424 468 T3

```

<211> 7
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<220>
10 <223> Ab10
<400> 99
His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
                    5
15 <210> 100
<211> 11
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <223> Ab10
<400> 100
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
                    5                10
30 <210> 101
<211> 360
35 <212> ADN
<213> Homo sapiens
40 <220>
<223> Ab11
<400> 101
45 cagggtgcagc tggtgcaatc 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

```


ES 2 424 468 T3

Glu Leu Ser Ile His

5

<210> 104

5

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

15

<400> 104

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

5

10

15

Gly

20 <210> 105

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<220>

30 <223> Ab11

<400> 105

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu

5

10

35

<210> 106

<211> 339

40 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

45

<223> Ab11

<400> 106

ES 2 424 468 T3

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taticataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 107

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab11

15 <400> 107

ES 2 424 468 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 Gly
 100 105 110

Ala

<210> 108

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab11

15 <400> 108

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

<210> 109

20 <211> 7

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

30

ES 2 424 468 T3

<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

5 <210> 113

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <223> Ab12

<400> 113

Glu Leu Ser Ile His
 5

20 <210> 114

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 424 468 T3

<211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Ab12
 <400> 119
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 15
 <210> 120
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <223> Ab12
 <400> 120
 Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Pro Thr Glu Ile Arg
 30
 <210> 121
 <211> 360
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <223> Ab13
 <400> 121
 45 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 ggcaaagggg caatggtcac cgtctcgagt 360

ES 2 424 468 T3

<210> 122
 <211> 120
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Ab13
 <400> 122
 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
 15 100 105 110
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 123
 20 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab13
 30 <400> 123

ES 2 424 468 T3

Glu Leu Ser Ile His
5
<210> 124
5 <211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <220>
<223> Ab13
15 <400> 124
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
20 <210> 125
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab13
30 <400> 125
Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
5 10
35 <210> 126
<211> 339
<212> ADN
40 <213> Homo sapiens
<220>
45 <223> Ab13
<400> 126
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
50

ES 2 424 468 T3

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcaggac gggcatcatc 300

gtcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgcg 339

<210> 127

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Ab13

15 <400> 127

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 Gly
100 105 110

Ala

20

<210> 128

<211> 14

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 424 468 T3

<220>
 <223> Ab13
 5 <400> 128
 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 5 10
 10 <210> 129
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <223> Ab13
 <400> 129
 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 25 <210> 130
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 35 <223> Ab13
 <400> 130
 Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Thr Gly Ile Ile Val
 5 10
 40 <210> 131
 <211> 360
 45 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> Ab14
 <400> 131
 55 caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa ttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

ES 2 424 468 T3

<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab14
10 <400> 133
Glu Leu Ser Ile His
5
15 <210> 134
<211> 17
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab14
25 <400> 134
Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
5 10 15
30 Gly
<210> 135
<211> 11
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens
<220>
40 <223> Ab14
<400> 135
Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr
5 10
45 <210> 136
<211> 339
50 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
55 <223> Ab14
<400> 136

ES 2 424 468 T3

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

<210> 138

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab14

15 <400> 138

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

<210> 139

20 <211> 7

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab14

30 <400> 139

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

35 <210> 140

<211> 11

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<220>

45 <223> Ab14

ES 2 424 468 T3

<400> 140
 Gln Ser Tyr Asp Ser Glu Asp Arg Met Thr Glu
 5 10
 5 <210> 141
 <211> 360
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <223> Ab15
 <400> 141
 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 aatagccggg 300
 20 agcatccccg gctgggcctt tgactactgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 142
 <211> 120
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab15
 <400> 142
 35 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

ES 2 424 468 T3

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

<210> 143

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab15

15 <400> 143

Glu Leu Ser Ile His
5

<210> 144

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

30 <400> 144

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

Gly

35 <210> 145

<211> 11

ES 2 424 468 T3

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 Gly
100 105 110

Ala

5 <210> 148

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab15

15 <400> 148

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

20 <210> 149

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

30 <223> Ab15

<400> 149

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

35

ES 2 424 468 T3

<220>

<223> Ab16

5

<400> 157

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

Ala

10 <210> 158

<211> 14

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> Ab16

<400> 158

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

25

<210> 159

<211> 7

30

<212> PRT

ES 2 424 468 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<220>

<223> Ab17

10 <400> 162

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> 163

15

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

25

<400> 163

Glu Leu Ser Ile His
5

ES 2 424 468 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 gcgaccgtcg aggacggcct gagtggttcg 300
gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc ctaggtgctg 339

<210> 167

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab17

15 <400> 167

ES 2 424 468 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 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

<210> 168

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab17

15 <400> 168

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

<210> 169

20 <211> 7

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

30 <400> 169

ES 2 424 468 T3

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser

5

<210> 170

5

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab17

15

<400> 170

Ala Thr Val Glu Asp Gly Leu Ser Gly Ser Val

5

10

20 <210> 171

<211> 360

<212> ADN

25

<213> Homo sapiens

<220>

30 <223> Ab18

<400> 171

caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

tcattgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgttca tccactgggt gcgacagact 120

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aacagtgggg 300

tctttcagtg ggcccgcctt tcacctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

35

<210> 172

<211> 120

40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

45

<223> Ab18

ES 2 424 468 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>

<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

Ala

15 <210> 178

<211> 14

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<220>

25 <223> Ab18

<400> 178

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

30

<210> 179

<211> 7

ES 2 424 468 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <223> Ab18
 <400> 179
 10 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 <210> 180
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <223> Ab18
 25 <400> 180
 Gln Ser Tyr Asp Ser Gln Trp Asn Gln Pro Leu
 5 10
 <210> 181
 30 <211> 360
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab19
 40 <400> 181
 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
 45 tctgtcagtc gcatcacgta cggcttctgg ggcaaaggga caatggtcac cgtctcgagt 360
 <210> 182
 <211> 120

ES 2 424 468 T3

<213> Homo sapiens
 <220>
 5 <223> Ab19
 <400> 188
 Thr Gly Ser Gly Ser Asn Ile Gly Ala Pro Tyr Asp Val Ser
 10 5 10
 <210> 189
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <223> Ab19
 <400> 189
 25 His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 <210> 190
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> Ab19
 40 <400> 190
 Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Asn Pro His Val Ile
 5 10
 <210> 191
 45 <211> 360
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab20
 55 <400> 191
 caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120

ES 2 424 468 T3

cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga tttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240

ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300

tctttcagtc ccctgacgct gggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360

<210> 192

5

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

15

<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

20

<210> 193

<211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Ab20
 <400> 193
 Glu Leu Ser Ile His
 15
 <210> 194
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <223> Ab20
 <400> 194
 Gly Phe Asp Pro Glu Glu Asn Glu Ile Val Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 5 10 15
 30 Gly
 <210> 195
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <220>
 <223> Ab20
 <400> 195
 45 Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
 5 10
 <210> 196
 50 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55 <220>
 <223> Ab20

ES 2 424 468 T3

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

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> Ab20

15 <400> 198

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

<210> 199

20

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab20

30

<400> 199

His Asn Asn Lys Arg Pro Ser
5

35 <210> 200

<211> 11

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<220>

ES 2 424 468 T3

<223> Ab20
 <400> 200
 5 Ala Thr Val Asp Glu Ala Leu Ser Gly Ser Val
 5 10

<210> 201
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 201
 Tyr Leu Asp Phe Gln
 5

20 <210> 202
 <211> 385
 <212> PRT
 25 <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
 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

30 Asn Ser Gly Arg Glu Gly Thr Ala Ala Gln Asn Phe Ser Cys Phe Ile

ES 2 424 468 T3

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
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

ES 2 424 468 T3

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

<210> 203

5 <211> 316

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<220>

<223> Secuencia humana con marcador FLAG

15 <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

ES 2 424 468 T3

	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					

ES 2 424 468 T3

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

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Péptido FLAG sintético

15 <400> 204

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

20 1 5

<210> 205

<211> 298

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 205

ES 2 424 468 T3

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

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
 290 295

<210> 206

5 <211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 206

ES 2 424 468 T3

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

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

ES 2 424 468 T3

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

<210> 207

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab1

15 <400> 207

cagtctgtgc tgactcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagctc gatcagcacg 300
 attttcggcg gagggaccaa gctcaccgctc cta 333

<210> 208

20 <211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab1

30 <400> 208

ES 2 424 468 T3

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
 100 105 110

<210> 209

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab2

15 <400> 209

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 210

ES 2 424 468 T3

<211> 333
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Ab4
 <400> 213
 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300
 gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
 15 <210> 214
 <211> 111
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <223> Ab4
 <400> 214

ES 2 424 468 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

<210> 215

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab5

15 <400> 215

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttcaggaa cagccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa gggtcaccgctc cta 333

<210> 216

20

ES 2 424 468 T3

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> Ab7

<400> 219

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttcaggaa cagccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

10

<210> 220

<211> 111

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20

<223> Ab7

<400> 220

ES 2 424 468 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

<210> 221

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab8

15 <400> 221

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 222

ES 2 424 468 T3

<211> 111
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Ab8
 <400> 222
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 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
 <210> 223
 20 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <223> Ab9
 30 <400> 223
 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

ES 2 424 468 T3

<220>

<223> Ab10

5 <400> 225

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 ggtcaccgtc cta 333

<210> 226

10

<211> 111

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab10

20

<400> 226

ES 2 424 468 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

<210> 227

5 <211> 333

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Ab11

15 <400> 227

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctgggggtcc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg 300

gttttcggcg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 228

20 <211> 111

ES 2 424 468 T3

<212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Ab11
 10 <400> 228
 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
 15 <210> 229
 <211> 333
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <223> Ab12
 <400> 229
 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 30 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180

ES 2 424 468 T3

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagcc gaccgagatc 300

cgcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc cta 333

<210> 230

5 <211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab12

15 <400> 230

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

20 <210> 231

<211> 333

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

30 <223> Ab13

ES 2 424 468 T3

<400> 231

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcaggac gggcatcatc 300
 gtcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

5 <210> 232

<211> 111

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

15 <223> Ab13

<400> 232

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

ES 2 424 468 T3

<210> 233
 <211> 333
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <220>
 <223> Ab14
 <400> 233
 15 caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180
 cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcgagga caggatgacg 300
 gagttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
 <210> 234
 20 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <223> Ab14
 30 <400> 234
 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

ES 2 424 468 T3

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

<210> 235

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> Ab15

15 <400> 235

caggctgtgc tgactcagcc gtctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctcaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtt gattagcgcc 300

gccttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

20 <210> 236

<211> 111

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

30 <223> Ab15

ES 2 424 468 T3

<400> 236

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
 5 100 105 110

<210> 237

<211> 333

10

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<220>

<223> Ab16

<400> 237

20

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagccccaa actcctcatc tatcataaca acaagcggcc ctgaggggtc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc gcgacctccg acgagatcct gagtggttcg 300

gttttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333

<210> 238

ES 2 424 468 T3

<211> 333
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab18
10 <400> 241
caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatkataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180
cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccagtg gaaccagccc 300
15 ctcttcgggg gagggaccaa ggtcaccgtc cta 333
<210> 242
<211> 111
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <220>
<223> Ab18
30 <400> 242

ES 2 424 468 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

Trp Asn Gln Pro Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 243

<211> 333

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

15 <223> Ab19

<400> 243

caggctgtgc tgactcagcc gtcctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60

tcctgtactg ggagcggctc caacatcggg gcaccttatg atgtaagctg gtaccagcag 120

cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc taticataaca acaagcggcc ctcaggggctc 180

cctgaccgat tctctgcctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240

caggctgacg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagccggaa cccccacgtc 300

atcttcgggg gagggaccaa gctcaccgtc cta 333

20 <210> 244

ES 2 424 468 T3

<211> 360
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6 – Línea no germinal
10 <400> 247
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcatgtaaaa tttccggaca cagcctcagt gaactgtcca tccactgggt gcgacagact 120
cccacaaaag gatttgagtg gatgggagga ttgatcctg aagagaatga aatagtctac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcacatg accgaggaca catctataga cacggcctac 240
ctgaccctga gcagcctgag atccgacgac acggccgttt attattgttc aatagtgggg 300
15 tctttcagtc cgctaacgtt gggcctctgg ggcaaagga caatggtcac cgtctcgagt 360
<210> 248
<211> 120
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <220>
<223> Ab 6 – Línea no germinal
30 <400> 248

ES 2 424 468 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

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> 249

<211> 333

<212> ADN

10

<213> Homo sapiens

<220>

15

<223> Ab 6 – Línea no germinal

<400> 249

ES 2 424 468 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <220>
<223> Ab 6
<400> 254
10 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 5 10
<210> 255
15 <211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <220>
<223> Ab 6
25 <400> 255
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
<210> 256
30 <211> 15
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Ab 6
40 <400> 256
Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 5 10 15
45 <210> 257
<211> 32
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens
<220>
55 <223> Ab 6

ES 2 424 468 T3

<400> 257

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

5 <210> 258

<211> 10

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<220>

15 <223> Ab 6

<400> 258

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

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una molécula de anticuerpo aislada y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo, comprendiendo el dominio VH de anticuerpo las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (CDR) HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y comprendiendo el dominio VL las CDR de cadena ligera LCDR1, LCDR2 y LCDR3, donde las secuencias de aminoácidos de las CDR son:
- 5 HCDR1 SEQ ID NO: 53
HCDR2 SEQ ID NO: 54
10 HCDR3 SEQ ID NO: 55
LCDR1 SEQ ID NO: 58
LCDR2 SEQ ID NO: 59 y
LCDR3 SEQ ID NO: 60.
- 15 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo humano o humanizado.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 52 del dominio VH de anticuerpo.
- 20 4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 218 del dominio VL de anticuerpo.
5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde la molécula de anticuerpo es una IgG4.
- 25 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, donde la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo IgG4 humano que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 52 de dominio VH y una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 218 del dominio VL.
- 30 7. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para utilizar en un método de tratamiento de la artritis reumatoide, asma, respuesta alérgica, esclerosis múltiple, leucemia mieloide, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o inflamación de las vías respiratorias inducida por el humo.
- 35 8. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el tratamiento comprende administrar la composición combinada o junto con uno o más de los siguientes: AINE, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios modificadores de la enfermedad (FARME).
9. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el tratamiento comprende administrar la composición combinada con uno o más de los siguientes: inhibidores de cox, prednisona, Humira (adalimumab), metotrexato, Arava, Enbrel (Etanercept), Remicade (Infliximab), Kineret (Anakinra), Rituxan (Rituximab), Orencia (Abatacept), sales de oro, antimaláricos, sulfasalazina, d-penicilamina, ciclosporina A, diclofenac, ciclofosfamida y azatioprina.
- 40 10. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el tratamiento comprende administrar la composición combinada con metotrexato.
11. Un método para producir una molécula de anticuerpo que comprende cultivar una célula huésped que contiene el ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo, a continuación purificar la molécula de anticuerpo, donde la molécula de anticuerpo compete por la unión al dominio extracelular de GM-CSFR α con una molécula de anticuerpo que tiene la SEQ ID NO: 52 del dominio VH y la SEQ ID NO: 218 del dominio VL.
- 50 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, donde la molécula de anticuerpo se une al dominio extracelular de GM-CSFR α humano con una afinidad (K_D) inferior a 5 nM en un ensayo de resonancia de plasmón superficial.
- 55 13. Un método para producir una molécula de anticuerpo para GM-CSFR α humano, comprendiendo el método proporcionar, a través de la inserción, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de partida que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, un dominio VH que sea una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH de partida; donde
- 60 la CDR1 del VH de partida tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 53;
la CDR2 del VH de partida tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 54; y
la CDR3 del VH de partida tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 55;
combinar el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL para proporcionar una o más combinaciones VH/VL;

donde dichos dominios VL se proporcionan a través de la inserción, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VL de partida que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3; donde

- 5 la CDR1 del VL de partida tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 58;
la CDR2 del VL de partida tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 59; y
la CDR3 del VL de partida tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 60; y
analizar la combinación o combinaciones VH/VL para identificar una molécula de anticuerpo para GM-CSFR α humano.

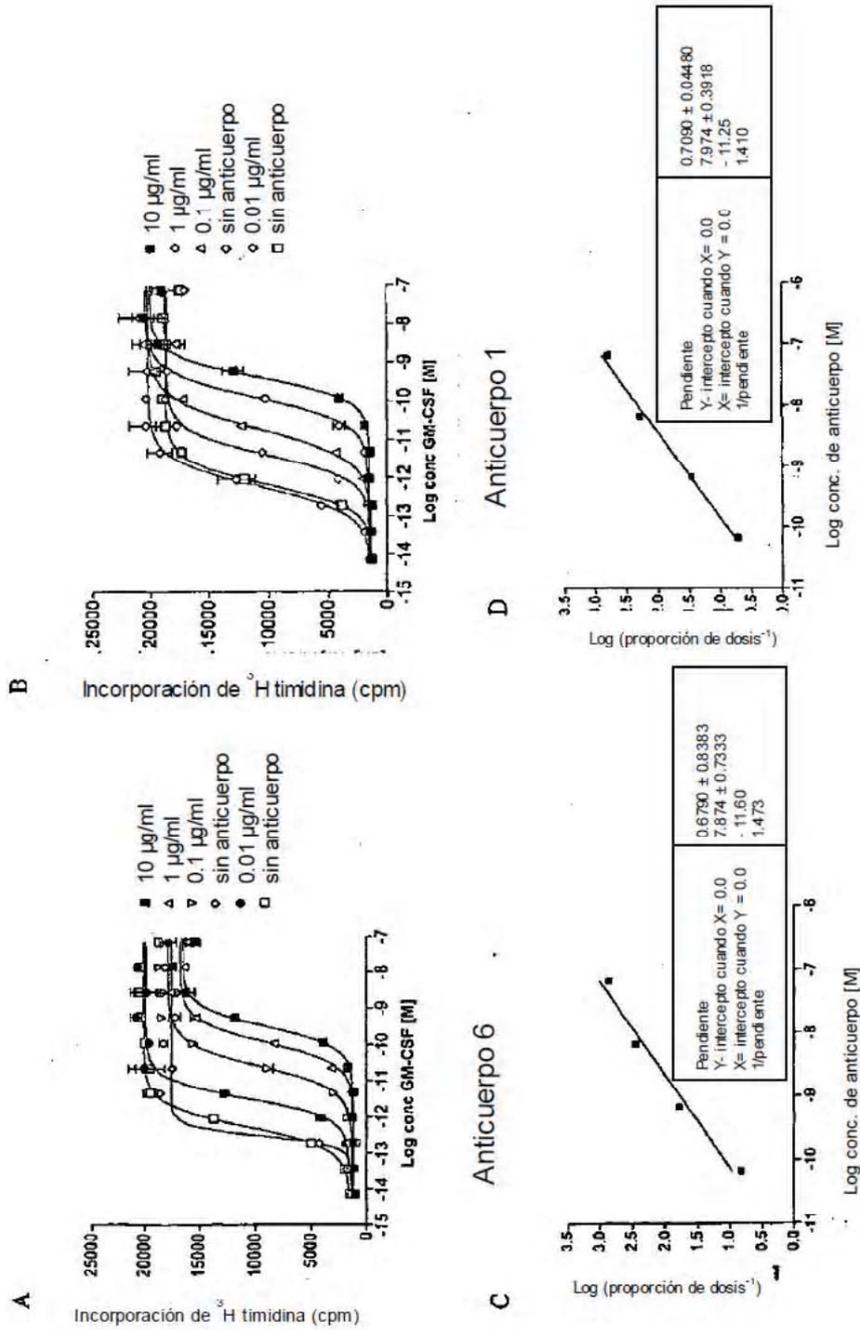


Figura 1

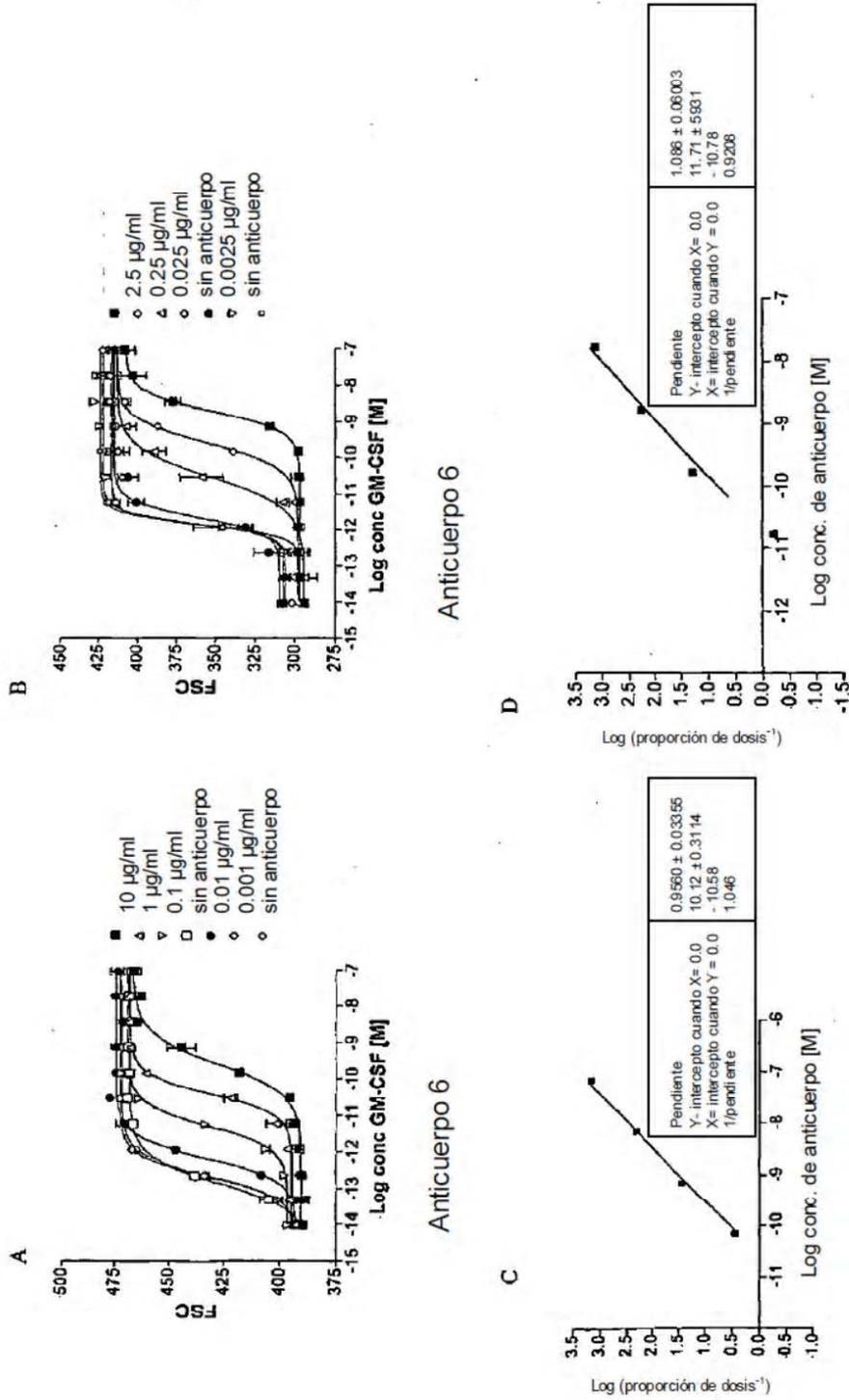


Figura 2

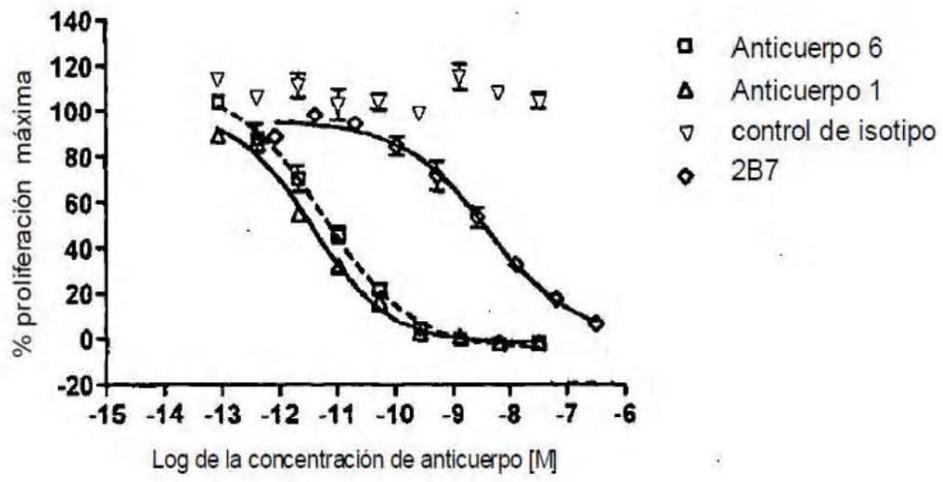


Figura 3

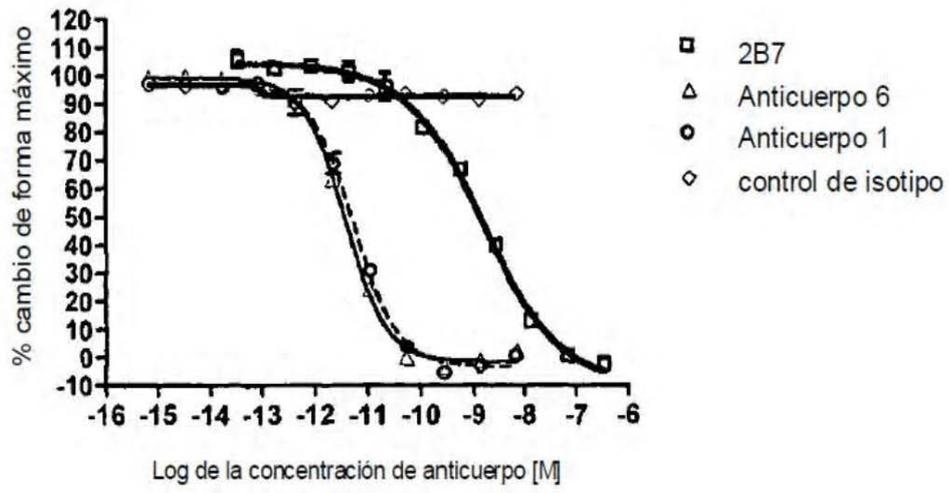


Figura 4

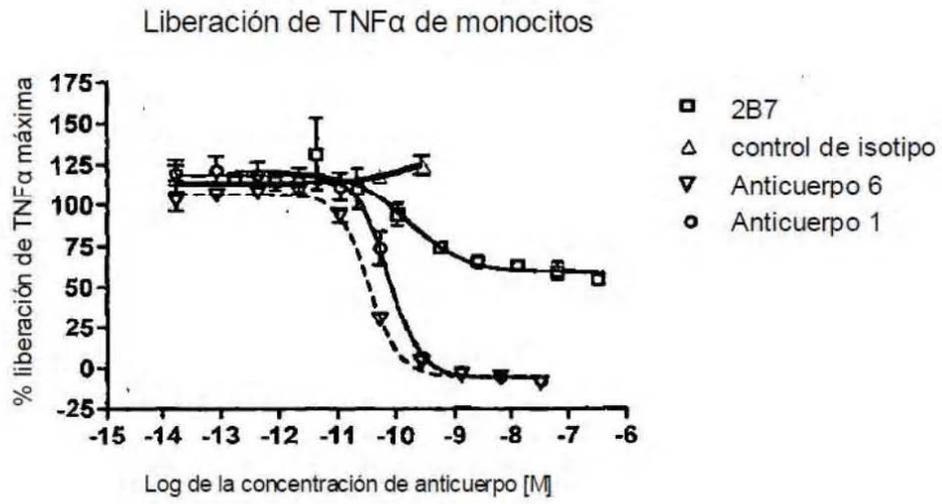


Figura 5

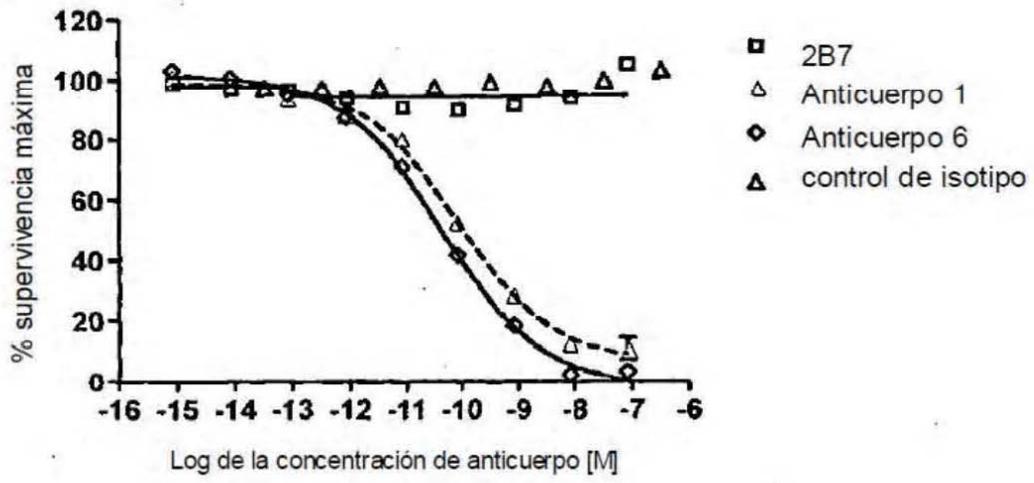


Figura 6

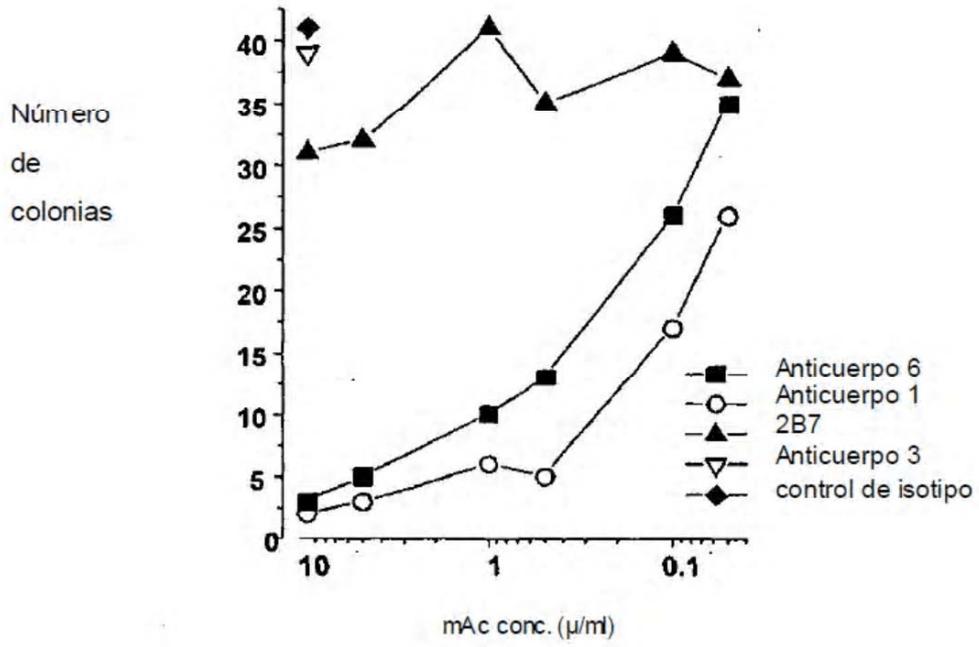


Figura 7

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

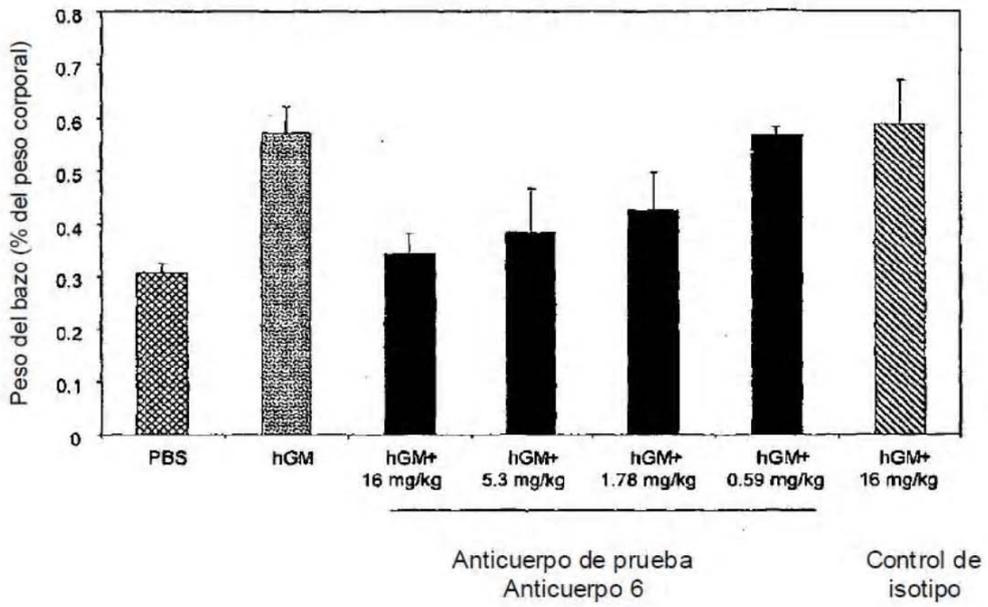


Figura 8

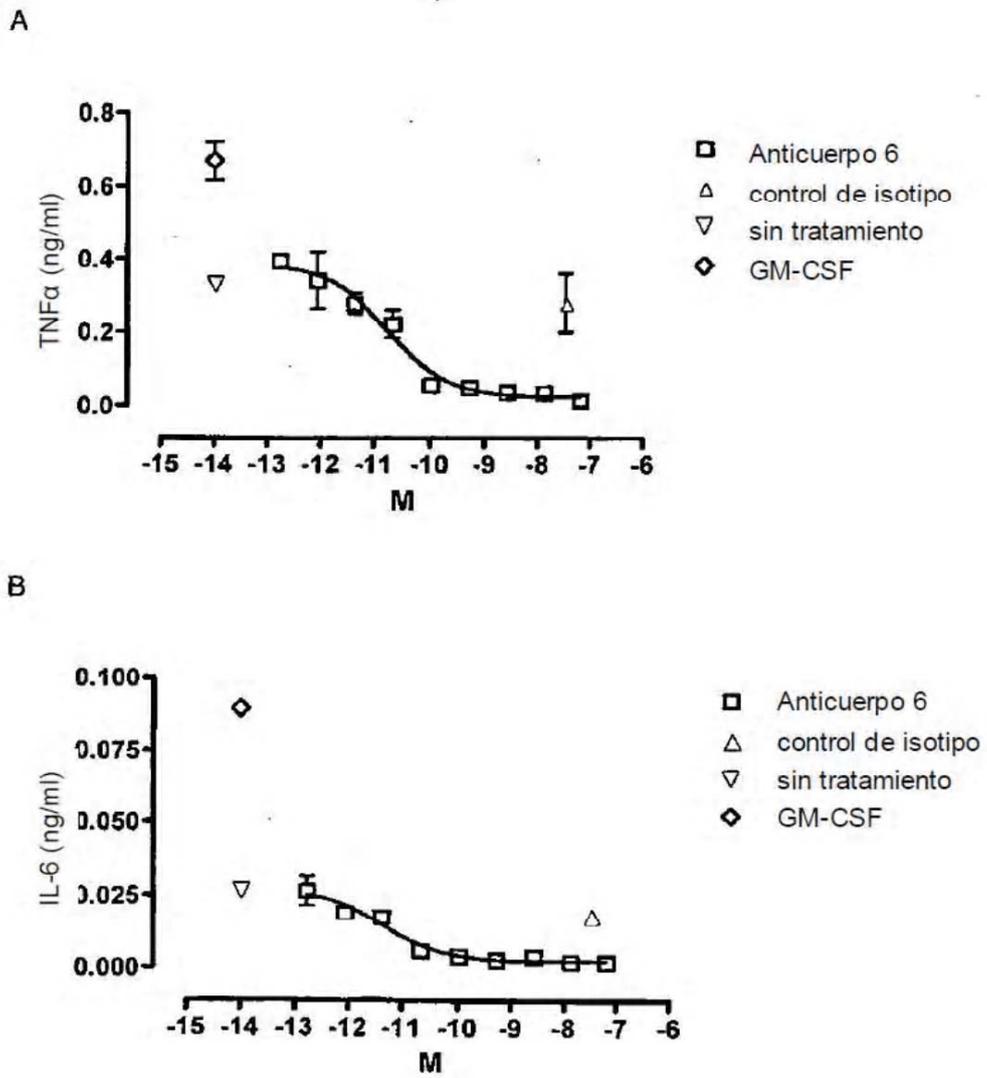


Figura 9