

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 506 065**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 14/535** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2007 E 07784767 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2056858**

54 Título: **Tratamiento de estados patológicos pulmonares**

30 Prioridad:

**11.08.2006 AU 2006904378**

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

**13.10.2014**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 POPLAR ROAD  
PARKVILLE, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**CRUMP, DAVID ERIC y  
NASH, ANDREW DONALD**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 506 065 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

Tratamiento de estados patológicos pulmonares

5 **Campo**

La presente invención se refiere en general a agentes que inhiben la actividad del receptor de G-CSF, que interfieren con la señalización de G-CSF, para su uso en el tratamiento o la prevención o la mejora de otro modo de los efectos de enfermedades pulmonares caracterizadas por o asociadas con infiltración de neutrófilos y complicaciones que surgen de la misma.

**Antecedentes**

Al final de la memoria descriptiva se enumeran detalles bibliográficos de referencias facilitadas en la memoria descriptiva objeto.

La referencia a cualquier técnica anterior no es, y no debe considerarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en ningún país.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una carga sanitaria global principal y se convertirá en la tercera mayor causa de muerte en el mundo hacia 2020 (Lopez y Murray, *Nat Med* 4 (11): 1241-1243, 1998). Una respuesta inflamatoria exagerada a agentes irritantes inhalados, en particular humo de cigarrillos, es la causa probable de una limitación del flujo de aire progresiva. Esta inflamación, donde los macrófagos y los neutrófilos son prominentes, conduce a estrés oxidativo, enfisema, fibrosis de vías respiratorias pequeñas e hipersecreción de moco. Sin embargo, la EPOC responde mal a los tratamientos antiinflamatorios actuales incluyendo glucocorticosteroides potentes que producen poco o ningún beneficio. Los pulmones con EPOC también pueden llegar a colonizarse con bacterias Gram negativas y Gram positivas que aceleran el deterioro de la función pulmonar y, junto con los virus y los contaminantes inhalados, son los agentes desencadenantes principales de exacerbaciones debilitantes recurrentes. Los pacientes con EPOC padecen exacerbaciones agudas recurrentes (EPOC-EA) producidas tanto por virus como por bacterias.

Los estudios de biopsia histológica y bronquial muestran que los pacientes con EPOC tienen un número aumentado de neutrófilos (Di Stefano *et al*, *Am J Respir Crit Care Med* 158(4):1277-1285, 1998; Retamales *et al*, *Am J Respir Crit Care Med* 164:469-473, 2001). Además, el LLBA y el esputo de pacientes con EPOC tienen un marcado aumento de neutrófilos (Pesci *et al*, *Eur Respir J*. 12(2):380-386, 1998; Keatings *et al*, *Am J Respir Crit Care Med* 153(2):530-534, 1996). El número de neutrófilos en biopsias bronquiales y esputo inducido están correlacionados con la gravedad de la enfermedad de EPOC (Di Stefano *et al*, 1998 citado anteriormente, Keatings *et al*, 1996 citado anteriormente) y con la tasa de deterioro en la función pulmonar (Stanescu *et al*, *Thorax* 51(3):267-271, 1996). Los neutrófilos secretan serina proteasas, incluyendo elastasa, catepsina G y proteasa-3 de neutrófilos, así como MMP-8 y MMP-9, que contribuyen a la destrucción alveolar y producen enfisema en animales de laboratorio (Stockely, *Am J Respir Crit Care Med* 160(5 Pt 2):S49-52, 1999; Barnes *et al*, *Eur Respir J* 22:672-688, 2003). Los neutrófilos migran al tracto respiratorio bajo la dirección de factores quimiotácticos de neutrófilos, que incluyen IL-8 (Barnes *et al*, citado anteriormente 2003). Las serina proteasas son estimulantes potentes de la hipersecreción de moco y pueden desempeñar un papel importante en la hipersecreción de moco observada en la bronquitis crónica (Sommerhoff *et al*, *J Clin Invest* 85(3):682-289, 1990).

Una citocina implicada en reacciones inflamatoria es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) que se codifica por el gen *CSF-3*. G-CSF es un factor de crecimiento hematopoyético que regula la producción de granulocitos (Nicola *et al*, *Nature* 314:625, 1985; Metcalf, *International Journal of Cancer* 25:225, 1980; Nicola *et al*, *Journal of Biological Chemistry* 258:9017, 1983). G-CSF media sus efectos a través de la interacción con el receptor de G-CSF (G-CSFR, codificado por el gen *CSFR-3*), un miembro de la superfamilia de receptores de citocinas de tipo I (Demetri *et al*, *Blood* 78:2791-2808, 1991). Las principales acciones biológicas de G-CSF en seres humanos y ratones incluyen aumentar la producción y liberación de neutrófilos a partir de la médula ósea (Souza *et al*, *Science* 232:61, 1986; Lord *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9499-9503, 1989), movilizar células progenitoras hematopoyéticas desde la médula hacia la sangre periférica (Bungart *et al*, *British Journal of Haematology* 22:1156, 1990; de Haan *et al*, *Blood* 86:2986-2992, 1995; Roberts *et al*, *Blood* 89:2736-2744, 1997) y modular las funciones de diferenciación y efectoras de neutrófilos maduros (Yong *et al*, *European Journal of Haematology* 49:251-259, 1992; Colotta *et al*, *Blood* 80:2012-2020, 1992; Rex *et al*, *Transfusion* 35:605-611, 1995; Gericke *et al*, *Journal of Leukocyte Biology* 57:455-461, 1995; Xu *et al*, *British Journal of Haematology* 93:558-568, 1996; Yong, *British Journal of Haematology* 94:40-47, 1996; Jacob *et al*, *Blood* 92:353-361, 1998). Se usa G-CSF para tratar neutropenia, así como para la movilización de células madre hematopoyéticas (CMH) para trasplante autólogo y alogénico de células madre (Welte *et al*, *Blood* 88:1907-1929, 1996).

Existe una necesidad urgente e inmediata de desarrollar nuevos tratamientos para estados inflamatorios tales como EPOC, sus formas exacerbadas tales como EPOC-EA y otras enfermedades pulmonares caracterizadas por o asociadas con infiltración de neutrófilos.

**Sumario**

- 5 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implican la inclusión de un elemento o número entero establecido o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.
- 10 Se hace referencia a secuencias de nucleótidos y aminoácidos mediante un número identificador de secuencia (SEQ ID NO:). Los SEQ ID NO: corresponden numéricamente a identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO: 1), <400>2 (SEQ ID NO: 2), etc. En la tabla 1 se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia. Tras las reivindicaciones se proporciona una lista de secuencias.
- 15 En el presente documento se da a conocer el uso de antagonistas de la actividad de G-CSF, su receptor y/o que inhiben la expresión de genes que codifican para G-CSF o su receptor en el tratamiento de enfermedades o estados pulmonares caracterizados por o asociados con infiltración de neutrófilos. En particular, la presente invención contempla el uso de agentes que inhiben G-CSFR en el tratamiento de enfermedad pulmonar inflamatoria crónica (EPOC) mediada por el sistema inmunitario, formas exacerbadas de la misma tales como EPOC exacerbada aguda (EPOC-EA). Las complicaciones que surgen de las mismas o las manifestaciones de las mismas incluyen bronquitis crónica, estrés oxidativo, enfisema, hipersecreción de moco, arritmias, cor pulmonale, neumonía y cáncer de pulmón.
- 20 La presente invención se basa en parte en la aclaración del papel de G-CSF en relación con EPOC o sus formas exacerbadas (por ejemplo EPOC-EA) o complicaciones de las mismas o manifestaciones de las mismas. Se propone que la inhibición de la actividad de G-CSF o G-CSFR de manera sistémica o local y/o la regulación por disminución de la expresión de un gen que codifica para un G-CSF o G-CSFR es útil en el tratamiento de estados pulmonares caracterizados por o asociados con infiltración de neutrófilos.
- 25 La referencia a “G-CSF” o su nombre completo “factor estimulante de colonias de granulocitos” incluye homólogos y derivados de G-CSF. Un “homólogo” o “derivado” incluye variantes polimórficas de G-CSF.
- 30 La referencia a “G-CSFR” o su nombre completo “receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos” incluye homólogos y derivados de G-CSFR. Un “homólogo” o “derivado” incluye variantes polimórficas de G-CSFR.
- 35 Por consiguiente, se da a conocer un método para el tratamiento de un estado pulmonar caracterizado por o asociado con infiltración de neutrófilos en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad de un agente eficaz para inhibir la actividad de G-CSF o G-CSFR o inhibir la expresión del gen que codifica para G-CSF o G-CSFR.
- 40 En una realización particular, la invención proporciona un agente que inhibe G-CSFR, en el que dicho agente es un anticuerpo específico para G-CSFR para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o una forma exacerbada de la misma en un sujeto.
- 45 Generalmente, el agente es para su administración durante un tiempo y en condiciones suficientes para mejorar los síntomas del estado pulmonar.
- 50 La administración puede ser sistémica o local. La administración sistémica es particularmente útil. La referencia a “administración sistémica” incluye inyección intraarticular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea, infusión, así como administración a través de las vías oral, rectal y nasal, o a través de inhalación. Se prefiere particularmente la administración mediante inyección subcutánea o a través de inhalación.
- 55 En el presente documento se describen agentes de moléculas proteínicas, no proteínicas (por ejemplo, entidades químicas) y de ácido nucleico, que también pueden usarse en los tratamientos.
- 60 Las moléculas proteínicas y no proteínicas incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas, moléculas químicas pequeñas, intermedias o grandes, así como moléculas identificadas a partir del examen de productos naturales o del examen de bibliotecas químicas. El examen de productos naturales incluye el examen de extractos o muestras de plantas, microorganismos, suelo, lechos de ríos, coral, entornos acuáticos y entornos extraterrestres para detectar moléculas o grupos de moléculas que tienen un efecto sobre la actividad de G-CSF o el nivel de la expresión génica de G-CSF. Estas moléculas también pueden afectar a la interacción G-CSF/G-CSFR.
- La presente invención contempla además la terapia de combinación tal como la selección como diana de G-CSFR y una o más de otras dianas inflamatorias.
- 65 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un agente que inhibe G-CSFR, en el que dicho agente es un anticuerpo específico para G-CSFR y al menos otro agente terapéutico seleccionado de un

antiinflamatorio, un broncodilatador o un antibiótico para su uso en el tratamiento de EPOC o una forma exacerbada de la misma tal como EPOC-EA, en un sujeto.

5 El agente de la invención es un anticuerpo que inhibe la actividad de G-CSFR. Otros agentes dados a conocer en el presente documento incluyen anticuerpos que inhiben la actividad de un G-CSF, inhibidores de molécula pequeña, receptores de G-CSF solubles y moléculas de ácido nucleico que inhiben la expresión génica de G-CSF o G-CSFR. El anticuerpo puede ser monoespecífico o multiespecífico, incluyendo biespecífico.

10 Por tanto, en una realización particularmente preferida, la presente invención contempla la administración a un sujeto de una cantidad de un anticuerpo eficaz para inhibir la actividad de G-CSFR.

15 En el presente documento se dan a conocer tratamientos alternativos, pero se encuentran fuera del alcance de las reivindicaciones. Por ejemplo, en el presente documento se dan a conocer moléculas sentido o antisentido dirigidas al gen o ARNm de G-CSF o al gen o ARNm de G-CSFR para este fin, así como moléculas sentido o antisentido contra cualquier parte de las regiones codificantes o no codificantes incluyendo la secuencia líder e intrones o exones seleccionados del gen o ARNm de G-CSF o G-CSFR. Por tanto, podrían usarse moléculas sentido y antisentido de 20 a 30 bases de nucleótidos de longitud dirigidas a una o más de SEQ ID NO: 2, 3, 6 ó 7.

20 Los sujetos preferidos son mamíferos y en particular seres humanos.

También se describe en el presente documento el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de la expresión génica o la actividad de G-CSF o G-CSFR. Una composición puede comprender un anticuerpo anti-G-CSF o un anticuerpo anti-G-CSFR.

25 La presente invención contempla además el uso de un anticuerpo específico para G-CSFR en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de EPOC o una forma exacerbada de la misma en un sujeto.

30 Expresado de manera alternativa, la invención proporciona el uso de un agente que inhibe la actividad de G-CSFR en la fabricación de un medicamento para tratar EPOC en un sujeto, en el que dicho agente es un anticuerpo específico para G-CSFR.

En la tabla 1 se proporciona un resumen de identificadores de secuencia usados a lo largo de toda la memoria descriptiva objeto.

35 Tabla 1

<b>Resumen de identificadores de secuencia</b>	
<b>SECUENCIA ID NO:</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
1	Secuencia de aminoácidos de G-CSF humano incluyendo la secuencia líder
2	Secuencia de nucleótidos codificante y no codificante de G-CSF humano
3	Secuencia de nucleótidos de G-CSF humano que codifica para la proteína madura
4	Secuencia de aminoácidos de la proteína madura de G-CSF humano
5	Secuencia de aminoácidos de G-CSFR3 humano incluyendo la secuencia líder
6	Secuencia de nucleótidos codificante y no codificante de G-CSF3R humano
7	Secuencia de nucleótidos de G-CSF3R humano que codifica para la proteína madura
8	Secuencia de aminoácidos de la proteína madura de G-CSF3R

**Breve descripción de las figuras**

40 La figura 1 es una representación gráfica que muestra ratones tratados con o bien control de isotipo o bien 250 µg/dosis i.p. de anticuerpo anti-G-CSF (también denominado anticuerpo αG-CSF o anti-GCSF) a t = -3 horas, expuestos a una dosis de LPS a t = 0, y luego diseccionados 24 horas más tarde.

45 Las figuras 2a a d son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el LLBA de ratones tratados con LPS tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo αG-CSF. Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales tratados con LPS y animales tratados con LPS + anticuerpo αG-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo ± EEM. P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

5 La figura 3 es una representación gráfica de los niveles proteicos de TNF $\alpha$  en el LLBA de ratones tratados con LPS tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinaron los niveles proteicos de TNF $\alpha$  en el LLBA de animales control, animales tratados con LPS y animales tratados con LPS + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante ELISA. Los datos se expresan como la media de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM. P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos.

10 Las figuras 4a a c son representaciones gráficas de los niveles de MMP9 y la actividad proteasa en el LLBA de ratones tratados con LPS tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinaron los niveles de MMP9 en el LLBA de animales control, animales tratados con LPS y animales tratados con LPS + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante zimografía. Se determinó la actividad proteasa en el LLBA de ratones tratados mediante ensayo de gelatinasa y serina proteasa. Los datos se expresan como la muestra combinada de 8 ratones por grupo (figura 3.3a) y la media de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM (figura 3.3b y c). P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

15 Las figuras 5a a c son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos y neutrófilos en sangre completa de ratones tratados con LPS tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinó el número de células inflamatorias en la sangre completa de animales control, animales tratados con LPS y animales tratados con LPS + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM. P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos.

25 La figura 6 es una representación gráfica que muestra el humo generado en volúmenes tidales de 50 ml a lo largo de 10 s usando una velocidad de quemado de cigarrillos y un volumen de inhalación de humo normales que imitan la aspiración programada.

30 Las figuras 7a a d son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el LLBA de ratones expuestos a humo o expuestos de manera simulada tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales expuestos a humo y animales expuestos a humo + tratados con anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de 8 animales por grupo  $\pm$  EEM. P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

35 La figura 8 es una representación gráfica de los niveles proteicos de TNF $\alpha$  en el LLBA de ratones expuestos a humo o expuestos de manera simulada tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinaron los niveles proteicos de TNF $\alpha$  en el LLBA de animales control, animales expuestos a humo y animales expuestos a humo + tratados con anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante ELISA. Los datos se expresan como la media de 8 animales por grupo  $\pm$  EEM. P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos.

40 Las figuras 9a a c son representaciones gráficas de los niveles de MMP9 y la actividad proteasa en el LLBA de ratones expuestos a humo o expuestos de manera simulada tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinaron los niveles de MMP9 en el LLBA de animales control, animales tratados con LPS y animales tratados con LPS + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante zimografía. Se determinó la actividad proteasa en el LLBA de ratones tratados mediante ensayo de gelatinasa y serina proteasa. Los datos se expresan como la muestra combinada de 8 ratones por grupo y la media de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM.

45 Las figuras 10a a c son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos y neutrófilos en sangre completa de ratones expuestos a humo o expuestos de manera simulada tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales expuestos a humo y animales expuestos a humo + tratados con anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM. P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

55 La figura 11 es una representación gráfica que muestra ratones tratados con o bien control de isotipo o bien 250  $\mu$ g/dosis i.p. de  $\alpha$ G-CSF a t=d-1 y d2, y luego diseccionados en el día 3 o el día 10.

60 Las figuras 12a a d son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el LLBA de ratones expuestos a humo, tratados con virus influenza tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF (día 3 tras la infección). Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales tratados con virus influenza + expuestos a humo y animales tratados con virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM. P<0,05 (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

Las figuras 13a a d son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el

5 LLBA de ratones expuestos a humo, tratados con virus influenza tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF (día 10 tras la infección). Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales tratados con virus influenza + expuestos a humo y animales tratados con virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM.  $P < 0,05$  (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

10 Las figuras 14 y b son representaciones gráficas de los niveles proteicos de  $TNF\alpha$  en el LLBA de ratones expuestos a humo, tratados con virus influenza tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF (días 3 y 10 tras la infección). Se determinaron los niveles proteicos de  $TNF\alpha$  en el LLBA de animales control, animales tratados con virus influenza + expuestos a humo y animales tratados con virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante ELISA. Los datos se expresan como la media de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM.  $P < 0,05$  (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

15 Las figuras 15a a f son representaciones gráficas de los niveles de MMP9 y la actividad proteasa en el LLBA de ratones expuestos a humo, tratados con virus influenza tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF (días 3 y 10 tras la infección). Se determinaron los niveles de MMP9 en el LLBA de animales control, animales tratados con virus influenza + expuestos a humo y animales tratados con virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante zimografía. Se determinó la actividad proteasa en el LLBA de ratones tratados mediante ensayo de gelatinasa y serina proteasa. Los datos se expresan como la muestra combinada de ocho ratones por grupo y la media de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM.  $P < 0,05$  (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

20 Las figuras 16a a c son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos y neutrófilos en sangre completa de ratones expuestos a humo, tratados con virus influenza tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF (día 3 tras la infección). Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales tratados con virus influenza + expuestos a humo y animales tratados con virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM.  $P < 0,05$  (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

30 Las figuras 17a a c son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos y neutrófilos en sangre completa de ratones expuestos a humo, tratados con virus influenza tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF (día 10 tras la infección). Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales tratados con virus influenza + expuestos a humo y animales tratados con virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM.  $P < 0,05$  (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

40 La figura 18 es una representación gráfica de títulos virales en los pulmones de animales control, animales tratados con virus influenza + expuestos a humo y animales tratados con virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF determinados mediante titulación de ensayo en placa convencional. Los datos se expresan como la media de 8 animales por grupo  $\pm$  EEM. ns = no significativo.

45 La figura 19a a d son representaciones gráficas de células viables totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el LLBA de ratones expuestos a humo o expuestos de manera simulada tras el tratamiento con isotipo o anticuerpo  $\alpha$ G-CSF. Se determinó el número de células inflamatorias en el LLBA de animales control, animales expuestos a humo y animales expuestos a humo + tratados con anticuerpo  $\alpha$ G-CSF mediante análisis leucocitario convencional. Los datos se expresan como el número medio de células/ml de LLBA de ocho animales por grupo  $\pm$  EEM.  $P < 0,05$  (anotado mediante \*) son estadísticamente significativos, ns = no significativo.

50 **Descripción detallada**

55 Antes de describir la presente invención en detalle, ha de entenderse que a menos que se indique otra cosa, la invención objeto no se limita a formulaciones específicas de componentes, métodos de fabricación, regímenes de diagnóstico o dosificación, o similares. También ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitativa.

60 Las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen los aspectos plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una citocina” incluye una única citocina así como dos o más citocinas; la referencia a “un anticuerpo” incluye un único anticuerpo, así como dos o más anticuerpos; la referencia a “la invención” incluye una única invención o múltiples invenciones; etc.

La presente invención se refiere a un agente que inhibe G-CSFR, en el que dicho agente es un anticuerpo específico para G-CSFR para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o una forma

exacerbada de la misma en un sujeto. Expresado de manera alternativa, la invención proporciona el uso de un agente, en el que dicho agente es un anticuerpo específico para G-CSFR en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o una forma exacerbada de la misma en un sujeto.

- 5 En la descripción y las reivindicaciones la presente invención, se usa la siguiente terminología según las definiciones expuestas a continuación.

Los términos “agente”, “compuesto” y “principio activo” pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento para referirse a una sustancia que induce un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Los términos también engloban formas farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activas de los mismos, incluyendo sales. El efecto deseado es la inhibición de la señalización de G-CSF.

La presente invención también contempla terapia de combinación que implica el uso de un antagonista de G-CSFR, que es un anticuerpo específico para G-CSFR, junto con otro agente terapéutico seleccionado de un antiinflamatorio, un broncodilatador y/o un antibiótico.

Los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales y todas las diversas formas derivadas de anticuerpos monoclonales, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos de longitud completa (por ejemplo que tienen una región Fc intacta), fragmentos de unión a antígenos, incluyendo por ejemplo, los fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>; y polipéptidos derivados de anticuerpos producidos usando métodos recombinantes tales como anticuerpos de cadena sencilla. Los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” tal como se usan en el presente documento también se refieren a anticuerpos humanos producidos por ejemplo en animales transgénicos o a través de presentación en fago, así como a anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos primatizados. La selección del fragmento o las formas modificadas de los anticuerpos también puede implicar cualquier efecto que los fragmentos o las formas modificadas tienen sobre sus semividas. Por ejemplo, en determinadas circunstancias puede ser ventajoso que un anticuerpo tenga una semivida corta para evitar los efectos globales del tratamiento con anticuerpos anti-G-CSF, tales como la neutropenia. Alternativamente, cuando las exacerbaciones son comunes o probables, puede ser ventajoso un anticuerpo con una semivida más larga. En el presente documento se considera que una “semivida” para un anticuerpo es corta si está dentro de 2 días o menos. Una semivida más larga para un anticuerpo sería cualquier semivida por encima de 2 días y más preferiblemente puede ser mayor de 7 días.

El término “anticuerpo monoclonal” se usa en el presente documento para referirse a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. El modificador “monoclonal” tal como se usa en el presente documento indica por tanto el carácter del anticuerpo al obtenerse de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se usa para indicar que el anticuerpo se produjo mediante un método particular. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales según la presente invención mediante el método del hibridoma descrito por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-499, 1975, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.816.567). También pueden aislarse anticuerpos monoclonales de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al*, *Nature* 352:624-628, 1991 o Marks *et al*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991.

Los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usan en el presente documento significan una cantidad suficiente de un agente que proporciona el efecto o desenlace terapéutico o fisiológico deseado, inhibiendo la actividad de G-CSFR. Además, el efecto puede ser una mejora de EPOC o de una forma exacerbada de la misma (por ejemplo EPOC-EA). A veces pueden manifestarse efectos no deseados, por ejemplo efectos secundarios, junto con el efecto terapéutico deseado; por tanto, un médico sopesa los posibles beneficios frente a los posibles riesgos en la determinación de cuál es una “cantidad eficaz” apropiada. La cantidad exacta de agente requerido variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por tanto, puede no ser posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, puede determinarse una “cantidad eficaz” apropiada en cualquier caso individual por un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina. Por ejemplo, puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo αG-SFR para mejorar los efectos de EPOC o una forma exacerbada de la misma en un sistema de modelo animal. Un experto habitual en la técnica podría determinar las cantidades requeridas basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

En la medida en que la presente invención se refiere al uso de anticuerpos frente al receptor de G-CSF, la cantidad eficaz incluye desde aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal hasta 20 mg/kg de peso corporal de anticuerpo tal como 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/kg de peso corporal, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/kg de peso corporal o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 mg/kg de peso corporal. Se proporcionan cantidades similares para terapia individual o de combinación.

La referencia a “un estado o enfermedad pulmonar” incluye cualquier respuesta inflamatoria exagerada o excesiva o

prolongada en los pulmones o el sistema pulmonar, que puede estar estimulada por un objeto extraño o irritante tal como pero sin limitarse a humo, polvo, gases, partículas, bacterias, hongos, levaduras o virus. Una variedad de complicaciones y manifestaciones de estados pulmonares incluyen formas exacerbadas (por ejemplo EPOC-EA), estrés oxidativo, enfisema, bronquitis, hipersecreción de moco, cor pulmonale (insuficiencia cardíaca del lado derecho o aumento del tamaño del corazón e insuficiencia cardíaca asociada con enfermedad pulmonar crónica), arritmias, neumonía y cáncer de pulmón. Las complicaciones y manifestaciones incluyen síndrome de dificultad respiratoria aguda y lesión pulmonar aguda. El estado pulmonar puede ser crónico o agudo o un estadio entremedias. Las formas agudas recurrentes incluyen exacerbaciones de un estado crónico.

5  
10 La presente invención se refiere a EPOC y sus formas exacerbadas (por ejemplo EPOC-EA). Los estados y complicaciones y manifestaciones relacionados de las mismas se explicaron de manera resumida anteriormente.

Un portador y/o diluyente "farmacéuticamente aceptable" es un vehículo farmacéutico compuesto por un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un sujeto junto con el agente activo seleccionado sin provocar ninguna o una reacción adversa sustancial. Los portadores pueden incluir todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes usados para ajustar la tonicidad, tampones, agentes quelantes y agentes retardadores de la absorción y similares.

15  
20 De manera similar, una sal "farmacológicamente aceptable" de un compuesto tal como se proporciona en el presente documento es una sal que no es indeseable biológicamente o de otro modo.

Los términos "tratar" y "tratamiento" tal como se usan en el presente documento se refieren a un tratamiento terapéutico y pueden incluir medidas profilácticas o preventivas. Por ejemplo, el tratamiento puede dar como resultado una reducción en la gravedad y/o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad pulmonar (EPOC según la invención), la eliminación de los síntomas y/o la causa subyacente de la inflamación, la prevención de la aparición de los síntomas de la inflamación y/o su causa subyacente y la mejora o remedio o alivio del daño tras la inflamación. Por tanto, el tratamiento puede no dar como resultado una "cura" sino más bien una mejora de los síntomas. Además, el tratamiento puede no comenzar hasta que se produce un acontecimiento exacerbado. En este contexto, el término "profiláctico" también se aplica a la prevención o el tratamiento de una probabilidad de que se produzca un acontecimiento exacerbado.

25  
30  
35 Los términos "tratar" y "tratamiento" tal como se usan en el presente documento también se refieren a la reducción de uno o más síntomas o características asociadas con enfermedades pulmonares caracterizadas por o asociadas con infiltración de neutrófilos. Tales síntomas o características incluyen infiltración de neutrófilos aumentada, neutrófilos aumentados en el LLBA y el esputo, función pulmonar deteriorada, niveles aumentados de serina proteasas, tales como, pero sin limitarse a, elastasa, cathepsina G y proteasa-3 de neutrófilos, así como MMD-8 y MMP-9.

40 De manera similar, los anticuerpos quiméricos pueden incluir anticuerpos frente a G-CSFR que comprenden las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de rata o conejo frente a G-CSFR y dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras humanas.

45 Los términos "estado" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable a lo largo de toda la memoria descriptiva objeto.

Un "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano que puede beneficiarse del agente y el uso de la presente invención. No hay limitación sobre el tipo de animal que podría beneficiarse del agente y el uso descrito en el presente documento. Un sujeto, independientemente de si es un ser humano o un animal no humano, puede denominarse individuo, paciente, animal, huésped o receptor así como sujeto. El agente y el uso de la presente invención tienen aplicaciones en medicina humana y medicina veterinaria.

50  
55 Los mamíferos preferidos son seres humanos y animales de prueba de laboratorio. Los ejemplos de animales de prueba de laboratorio incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas, hámsteres, gatos y perros.

El agente de la presente invención es un anticuerpo frente a G-CSFR que inhibe la señalización de G-CSF a través del receptor de G-CSF. Los anticuerpos frente a G-CSF pueden denominarse anticuerpos anti-G-CSF o  $\alpha$ G-CSF, y los anticuerpos frente a G-CSFR pueden denominarse anticuerpos anti-G-CSFR o  $\alpha$ G-CSFR.

60  
65 Aunque tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales pueden producirse fácilmente, los anticuerpos monoclonales se prefieren particularmente ya que puede generarse en grandes cantidades, son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son homogéneas, haciéndolas ideales para generar fragmentos de unión a antígeno y otros derivados de anticuerpos obtenidos mediante ingeniería genética para aplicaciones terapéuticas.

Aunque los anticuerpos policlonales también se preparan de manera relativamente fácil, no son tan útiles como los anticuerpos monoclonales ya que las preparaciones de anticuerpos policlonales normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra sitios antigénicos diferentes y por tanto no son adecuados para generar fragmentos de unión a antígeno y otros derivados de anticuerpos obtenidos mediante ingeniería genética para aplicaciones terapéuticas.

El método del hibridoma descrito anteriormente se usa en animales, tales como ratones, para producir anticuerpos monoclonales. Sin embargo, los anticuerpos derivados de animales generalmente no son adecuados para su administración a seres humanos ya que pueden producir una respuesta inmunitaria. Tal como se describe a continuación, tales anticuerpos pueden modificarse para convertirlos en adecuados para su administración a seres humanos o al sujeto no humano deseado.

Los anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR, por ejemplo, también pueden producirse usando métodos recombinantes (por ejemplo, en un sistema de expresión de *E. coli*) bien conocidos en la técnica. En este enfoque, puede aislarse ADN que codifica para anticuerpos monoclonales, tales como los anticuerpos monoclonales murinos de la presente invención, a partir de líneas celulares de hibridoma, secuenciarse usando procedimientos convencionales y manipularse opcionalmente usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, el ADN puede fusionarse a otro ADN de interés, o alterarse (tal como mediante mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, deletar o sustituir uno o más residuos de ácido nucleico. Puede colocarse el ADN en vectores que entonces se transfectan o transforman en células huésped apropiadas usando métodos bien conocidos en la técnica (tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs: 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461 y 4.959.455). El ADN aislado de las líneas celulares de hibridoma también puede modificarse para cambiar el carácter del anticuerpo producido por su expresión.

Por ejemplo, pueden producirse formas quiméricas de anticuerpos monoclonales  $\alpha$ G-CSFR murinos reemplazando los nucleótidos que codifican para dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras murinas seleccionadas con nucleótidos que codifican para dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras humanas, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.816.567 y por Morrison *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984. Entonces pueden producirse los anticuerpos quiméricos en una línea celular apropiada, tal como una línea celular de mieloma murino, que se ha transfectado con ADN modificado.

Por tanto, entre los anticuerpos contemplados por la presente invención están anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR quiméricos que comprenden las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ G-CSFR murino fusionadas a dominios constantes de anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras no murinas. Preferiblemente, los dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras no murinas son los dominios constantes de anticuerpo de cadenas pesadas y ligeras humanas. De manera similar, los anticuerpos quiméricos pueden incluir anticuerpos frente a G-CSFR que comprenden las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos frente a G-CSFR de rata o conejo y dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras humanas.

Los anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR para su uso en la presente invención también incluyen anticuerpos humanizados. En general, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos (el anticuerpo receptor) en los que residuos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se han reemplazado por residuos de regiones CDR de una especie no humana (el anticuerpo donador), tal como de un ratón, rata, conejo o primate no humano. En algunos casos, también pueden sustituirse determinados residuos de regiones de entramado (FR) del anticuerpo humano por residuos no humanos correspondientes, o los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para potenciar el rendimiento y la afinidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de la al menos una, y normalmente dos, regiones variables, en las que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponde a las de un anticuerpo no humano, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las FR son las de una secuencia de anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado también puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de anticuerpo, normalmente la de un anticuerpo humano. (Jones *et al*, Nature 321:522-525, 1986; Reichmann *et al*, Nature 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992; Liu *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439, 1987; Larrick *et al* BiolTechnology 7:934, 1989; Winter & Harris, TIPS 14:139, 1993; Carter *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. 89:4285 1992). De manera similar, para crear un anticuerpo primatizado, pueden insertarse las regiones CDR murinas en una región de entramado de primate usando métodos conocidos en la técnica (véanse por ejemplo los documentos WO 93/02108 y WO 99/55369).

Alternativamente, puede crearse un anticuerpo humanizado mediante un procedimiento de "remodelación de superficie". Un análisis estadístico de regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humana y murina únicas reveló que los patrones precisos de residuos expuestos son diferentes en anticuerpos humanos y murinos, y que la mayoría de las posiciones de superficie individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de diferentes residuos (véanse Padlan *et al*, Mol. Immunol. 28:489-498, 1991 y Pedersen *et al*, J. Mol. Biol. 235:959-973, 1994). Por tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de una Fv no humana reemplazando los residuos expuestos en sus regiones de entramado que difieren de los encontrados habitualmente en anticuerpos

humanos. Puesto que la antigenicidad de las proteínas puede estar correlacionada con la accesibilidad a la superficie, el reemplazo de los residuos de superficie puede ser suficiente para hacer que la región variable de ratón sea "invisible" para el sistema inmunitario humano. Este procedimiento de humanización se denomina "remodelación de superficie" porque sólo se altera la superficie del anticuerpo, permaneciendo sin alterar los residuos de soporte.

5 Además, el documento WO 2004/006955 describe métodos para humanizar anticuerpos, basados en seleccionar secuencias de entramado de regiones variables de genes anticuerpos humanos comparando tipos de estructura canónica de CDR para secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con tipos de estructura canónica de CDR para CDR correspondientes de una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos, por ejemplo segmentos génicos de anticuerpos de línea germinal. Las regiones variables de anticuerpos humanos que tienen tipos de estructura canónica de CDR similares a las CDR no humanas forman un subconjunto de secuencias de anticuerpos humanos miembros del que seleccionar secuencias de entramado humanas. Los miembros del subconjunto pueden clasificarse adicionalmente por la similitud de aminoácidos entre las secuencias de CDR humanas y no humanas. En el método del documento WO 2004/006955, se seleccionan secuencias humanas de clasificación superior para proporcionar las secuencias de entramado para construir un anticuerpo quimérico que sustituye funcionalmente a las secuencias de CDR humanas con los homólogos de CDR no humanos usando las regiones de entramado humanas miembros del subconjunto seleccionado, proporcionando de ese modo un anticuerpo humanizado de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar secuencias de entramado entre los anticuerpos humanos y no humanos.

20 Las CDR de un anticuerpo dado pueden identificarse fácilmente, por ejemplo usando el sistema descrito por Kabat *et al* en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., US Department of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991).

25 En una realización preferida, los anticuerpos para su uso en la presente invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra G-CSFR pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM.

30 Todavía adicionalmente, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana en la técnica y pueden usarse para obtener anticuerpos. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963.

35 Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para obtener anticuerpos contra G-CSFR. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727, 2000.

40 También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando métodos de presentación en fago para examinar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fago para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse por ejemplo: las patentes estadounidenses n.ºs 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698; las patentes estadounidenses n.ºs 5.427.908 y 5.580.717; las patentes estadounidenses n.ºs 5.969.108 y 6.172.197 y las patentes estadounidenses n.ºs 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081.

50 También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que puede generarse una respuesta de anticuerpos humanos con la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.476.996 y 5.698.767.

55 Los anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR para su uso en la presente invención también incluyen fragmentos de unión a antígeno tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>. Tradicionalmente, los fragmentos de unión a antígeno se generaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos completos (Morimoto *et al*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117, 1992; Brennan *et al*, *Science* 229:81, 1985). Ahora se han desarrollado varios métodos recombinantes para producir fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos directamente en células huésped recombinantes.

60 Por ejemplo, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al*, *Bio/Technology* 10: 163-167, 1992). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> también pueden formarse usando la cremallera de leucinas GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula de F(ab')<sub>2</sub>. También pueden aislarse fragmentos Fv, Fab o F(ab')<sub>2</sub> directamente de cultivos de células huésped recombinantes. Se han desarrollado varios métodos recombinantes para la producción de anticuerpos de cadena sencilla incluyendo los descritos en la patente estadounidense n.º 4.946.778; Bird, *Science* 242:423, 1988, Huston *et al*, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 85:5879, 1988 y Ward *et al*, Nature 334:544, 1989. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden formarse uniendo fragmentos de región variable (región Fv) de cadenas pesadas (V<sub>H</sub>) y cadenas ligeras (V<sub>L</sub>) a través de un ligador peptídico corto para proporcionar una cadena polipeptídica individual (scFv). Las scFv también pueden formar dímeros o trímeros, dependiendo de la longitud del ligador peptídico entre las dos regiones variables (Kortt *et al*, Protein Engineering 10:423, 1997). La presentación en fago es otro método recombinante bien conocido para producir los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención.

Pueden examinarse los fragmentos de unión a antígeno para su uso en la presente invención para determinar propiedades deseadas. Los ensayos descritos en el presente documento proporcionan los medios para identificar fragmentos de unión a antígeno que se unen a G-CSFR y que antagonizan la señalización de G-CSF a través de G-CSFR.

Se conocen bien en la técnica líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Éstas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo Hep G2), células A549, células 3T3 y varias de otras líneas celulares. Las células huésped de mamífero incluyen células de ser humano, ratón, rata, perro, mono, cerdo, cabra, bovino, caballo y hámster. Se seleccionan líneas celulares de preferencia particular a través de la determinación de qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9, células de anfibio, células bacterianas, células vegetales y células fúngicas. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican para la cadena pesada o la parte de unión a antígeno de la misma, la cadena ligera y/o la parte de unión a antígeno de la misma en células huésped de mamífero, se producen los anticuerpos cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se hacen crecer las células huésped.

Pueden recuperarse anticuerpos del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales. Además, puede potenciarse la expresión de anticuerpos de la invención a partir de líneas de células huésped usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para potenciar la expresión en determinadas condiciones. El sistema GS se comenta en su totalidad o en parte en relación con las patentes europeas n.º 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la solicitud de patente europea n.º 89303964.4. Los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos pueden tener patrones de glicosilación diferentes entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos frente a G-CSFR de este tipo para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o formas exacerbadas de la misma forman parte de la presente invención, independientemente del patrón de glicosilación de los anticuerpos.

También se conocen técnicas para derivar un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente de un anticuerpo de interés, es decir cambio de subclase. Por tanto, pueden derivarse anticuerpos monoclonales IgG1 o IgG4 de un anticuerpo monoclonal IgM, por ejemplo, y viceversa. Tales técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo original), pero que también presentan propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente de el del anticuerpo original. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. Puede emplearse ADN clonado que codifica para polipéptidos de anticuerpo particulares en tales procedimientos, por ejemplo ADN que codifica para la región constante de un anticuerpo del isotipo deseado.

Se conocen bien en la técnica vectores disponibles para la clonación y expresión en líneas de células huésped e incluyen pero no se limitan a vectores para la clonación y expresión en líneas celulares de mamífero, vectores para la clonación y expresión en líneas celulares bacterianas, vectores para la clonación y expresión en fagos y vectores para la clonación y expresión en líneas celulares de insecto. Los anticuerpos pueden recuperarse usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

En una realización preferida, los anticuerpos para su uso en la presente invención son anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR humanos o humanizados que antagonizan la señalización de G-CSF a través de G-CSFR.

Preferiblemente, los anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR humanos o humanizados están en forma aislada, homogénea o completa o parcialmente purificada.

Más preferiblemente, los anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR humanos o humanizados son anticuerpos monoclonales de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno.

Tal como se indicó anteriormente, la selección de fragmentos de unión a antígeno o formas modificadas de los anticuerpos puede verse influida por el efecto que tienen los fragmentos o las formas modificadas sobre la semivida individual.

En el presente documento se describe una forma soluble del G-CSFR que compite con el G-CSFR asociado a la membrana que se produce de manera natural para la interacción con G-CSF. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente formas solubles del receptor, véase por ejemplo el documento US 5.589.456 y Honjo *et al.*

5 Los términos “ácidos nucleicos”, “nucleótido” y “polinucleótido” incluyen ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, hebras tanto sentido como antisentido, y pueden modificarse química o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de manera natural con un análogo (tal como el anillo de morfolina), modificaciones entre nucleótidos tales como enlaces no cargados (por ejemplo fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo polipéptidos), intercaladores (por ejemplo acridina, psoraleno, etc.), quelantes, algentes de alquilación y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos  $\alpha$ -anoméricos, etc.). Además se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de unión por puentes de hidrógeno y otras interacciones químicas. Tales moléculas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces fosfato en la estructura principal de la molécula.

20 Los términos “nucleobases” y “nucleótidos” pueden usarse de manera intercambiable.

El aspecto descrito anteriormente puede trabajarse mediante técnicas de biología molecular y ADN recombinante convencionales. Las técnicas se conocen bien en la técnica y se describen en diversas publicaciones, tales como Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *ADN Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II, D. N. Glover ed. 1985 y Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1994.

Los ácidos nucleicos pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras naturales (control de expresión), o pueden asociarse con secuencias heterólogas, incluyendo promotores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) y otras secuencias de sitio de unión a ribosomas, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificantes en 5' y 3', y similares.

Un “promotor” o “secuencia de promotor” es una región reguladora de ADN que puede unirse a una ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante. Una secuencia de promotor está unida generalmente en su extremo 3' terminal al sitio de inicio de la transcripción y se extiende en el sentido de 5' para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a cualquier nivel. Dentro de la secuencia de promotor puede encontrarse un sitio de inicio de la transcripción, así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) para la unión de ARN polimerasa. El promotor puede estar asociado operativamente con otras secuencias de control de la expresión, incluyendo secuencias potenciadoras y represoras o con un ácido nucleico. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión génica incluyen el promotor de citomegalovirus (CMV) y la región promotora temprana de SV40.

Una secuencia codificante está “bajo el control de”, “asociada funcionalmente con” o “asociada operativamente con” secuencias control de la transcripción y la traducción en una célula cuando las secuencias dirigen la transcripción mediada por la ARN polimerasa de la secuencia codificante para dar ARN, preferiblemente ARNm, que entonces puede someterse a corte y empalme en trans del ARN (si contiene intrones) y, opcionalmente, traducirse para dar un proteína codificada por la secuencia codificante.

Los términos “expresar” y “expresión” significan permitir o hacer que la información en una secuencia de gen, ARN o ADN se convierta en un producto, por ejemplo, producir una proteína activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de una secuencia de nucleótidos. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un “producto de expresión” tal como ARN (tal como ARNm o un ARN corto bicatenario, ARN en horquilla o ARN antisentido) o una proteína (tal como un antagonista de la actividad de citocina o una parte de un anticuerpo anti-citocina). También puede decirse que el propio producto de expresión se “expresa” por la célula.

Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” significan el vehículo (tal como un plásmido) mediante el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, para transformar el huésped y, opcionalmente, promover la expresión y/o replicación de la secuencia introducida.

El término “transfección” o “transformación” significa la introducción de un ácido nucleico en una célula. Estos términos pueden referirse a la introducción de un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo que reacciona de manera cruzada con citocina o un fragmento del mismo en una célula. Una célula huésped que recibe el ADN o ARN introducido se ha “transformado” y es un “transformante” o un “clon”. El ADN o ARN introducido en una célula huésped puede proceder de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula huésped, o células de un género o especie diferente.

El término “célula huésped” significa cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, modifica, transfecta,

transforma, hace crecer o usa o manipula de cualquier forma, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo, la expresión de una proteína o la replicación de un gen.

5 El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y vector compatible que, en condiciones adecuadas, pueden expresar una proteína o ácido nucleico que se porta por el vector y se introduce en la célula huésped. Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores de plásmido, células huésped de insecto y vectores de baculovirus, y células huésped y vectores de mamífero.

10 Los agentes dados a conocer en el presente documento (por ejemplo anticuerpos, proteínas tales como formas mutantes sin señalización de G-CSF, moléculas químicas pequeñas, receptores solubles, etc.) pueden suministrarse de manera conveniente en composiciones farmacéuticas.

15 Las formas de composición adecuadas para su uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles. Deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dilución que comprende, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse por  
20 diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes para ajustar la tonicidad, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con el principio activo y opcionalmente otros principios activos según se requiera, seguido por esterilización por filtración u otro medio de esterilización apropiado. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación adecuados incluyen la técnica de secado a vacío y liofilización que produce un polvo del principio activo más cualquier componente deseado  
30 adicionalmente.

35 Cuando el modulador se protege de manera adecuada, puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o puede encerrarse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o puede comprimirse para dar comprimidos, o puede incorporarse directamente con el alimento de la dieta o administrarse a través de la leche materna. Para la administración terapéutica oral, el principio activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos que pueden ingerirse, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos el 1% en peso de modulador. Naturalmente, el porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 5 y aproximadamente el 80% del peso  
40 de la unidad. La cantidad de modulador en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones pueden prepararse de modo que una forma farmacéutica unitaria oral contenga entre aproximadamente 0,1 µg y 200 mg de modulador. Las cantidades de dosificación alternativas incluyen desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 1000 mg y desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 500 mg. Estas dosificaciones pueden ser por individuo o por kg de peso corporal. La administración puede ser por hora, día, semana, mes o año.

45 Comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas, cremas y similares también pueden contener los componentes tal como se enumeran a continuación en el presente documento. Pueden añadirse un aglutinante tal como goma, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o aromatizante de cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido. Pueden estar presentes otros materiales diversos como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los  
50 comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Naturalmente, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma farmacéutica unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el/los compuesto(s) activo(s) puede(n) incorporarse en preparaciones y  
60 formulaciones de liberación sostenida.

Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para los agentes farmacéuticos activos se conoce bien en la técnica y  
65 excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el modulador, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse en las composiciones

compuestos activos complementarios.

Tal como se indicó anteriormente, la administración puede ser mediante cualquier medio. Para el tratamiento de estados inflamatorios pulmonares es particularmente eficaz la administración intranasal, intravenosa e intrapulmonar.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma farmacéutica unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

Un médico o veterinario que sea un experto habitual en la técnica puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis del anticuerpo  $\alpha$ G-CSFR para su uso en la presente invención, empleado en una composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición puede ser aquella cantidad del compuesto que sea la dosis inferior eficaz para producir un efecto terapéutico. Una dosis eficaz de este tipo dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea mediante inyección, preferiblemente próxima al sitio de la diana (por ejemplo, el pulmón). Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo de todo el día.

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos  $\alpha$ G-CSFR para su uso en la presente invención se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las comentadas anteriormente, incluyendo aquellas que pueden administrarse a un ser humano por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo mediante vías intrapulmonares, nasales, orales o intraarteriales.

Los modelos animales útiles para someter a prueba la inhibición de G-CSF o su receptor, u otros enfoques para el antagonismo de la actividad de G-CSF, incluyen exposición a LPS aguda, exposición a humo de cigarrillos subcrónica e infección por virus influenza de ratones expuestos a humo (modelo de exacerbación).

En estos modelos, la inflamación neutrofílica, la producción de  $TNF\alpha$  y la actividad proteasa excesiva permiten la determinación de la eficacia de anticuerpos  $\alpha$ G-CSF/ $\alpha$ G-CSFR u otros antagonistas, o niveles de G-CSF o señalización de G-CSF reducidos, en la supresión de algunas de las características clave de la inflamación de tipo EPOC.

Los neutrófilos son un tipo celular predominante principal que se infiltra en las vías respiratorias de pacientes con EPOC (Beeh y Beier, Clin Exp Allergy 26(2):142-157, 2006; Stockley, Chest 121(5 Supl.):151S-155S, 2002). La capacidad de los neutrófilos para generar especies reactivas de oxígeno y proteasas es crítica para su papel de defensa del huésped. Sin embargo, como con todos los aspectos de la respuesta inmunitaria, la actividad en exceso puede ser perjudicial.

El medio de citocina presente en las vías respiratorias de los pacientes con EPOC proporciona el entorno ideal para una inflamación neutrofílica potenciada (Barnes, N Engl J Med 343(4):269-280, 2000; Barnes, Cytokine Growth Factor Rev 14(6):511-522, 2003). Puesto que la supervivencia de los neutrófilos en el pulmón sano normalmente es muy limitada, la vida prolongada de los neutrófilos en EPOC es una característica importante.

Tal como se comenta en los ejemplos siguientes, la supresión de G-CSF con antagonista de prueba tuvo un efecto significativo sobre el número de neutrófilos en el LLBA y en la sangre inducido por LPS, exposición a humo de cigarrillos e infección por virus influenza. Puesto que los neutrófilos son mediadores clave de la inflamación de tipo EPOC, la reducción significativa en el número de neutrófilos inducida por el antagonista de G-CSF en los tres modelos de EPOC indica que el antagonismo de la actividad de G-CSF es un enfoque terapéutico útil.

En los ejemplos se emplean los métodos siguientes.

#### Animales

Se obtuvieron ratones Balb/C macho, libres de patógenos específicos de 7 semanas de edad y que pesaban ~20 g del Animal Resource Centre Pty. Ltd. (Perth, Australia). Se alojaron los animales a 20°C en un ciclo de día/noche de 12 h en microaisladores estériles y se alimentaron con una dieta estéril convencional de comida para ratón de Purina con agua permitida a voluntad.

#### Exposición a humo de cigarrillos

Se colocaron los ratones en una cámara de Perspex de 18 litros en una cabina de bioseguridad de clase II y se expusieron a humo de cigarrillos. Se expusieron los ratones a humo de cigarrillos generado a partir de 9 cigarrillos al día durante 4 días, administrado tres veces al día a las 8:00 am, a las 12 del medio día y a las 4 pm usando 3 cigarrillos separados por una hora. En experimentos piloto, se encontró que 3, 6 y 9 cigarrillos por día se toleran muy bien. Se colocaron ratones expuestos de manera simulada en una cámara de Perspex de 18 litros pero no recibieron humo de cigarrillos. En el quinto día, se sacrificaron los ratones mediante una sobredosis intraperitoneal (i.p.) de anestésico (5,6 mg de ketamina/1,12 mg de xilacina, Parnell Laboratories, NSW, Australia) y se lavaron los pulmones con PBS. Se usaron cigarrillos con filtro disponibles comercialmente (fabricados por Philip Morris, Australia) de la siguiente composición: 16 mg o menos de alquitrán, 1,2 mg o menos de nicotina y 15 mg o menos de CO. Se generó humo en volúmenes tidales de 50 ml a lo largo de 10 s usando una velocidad de quemado del cigarrillo y un volumen de inhalación de humo normales que imitan la aspiración programada. Se usaron tamaños de grupo de 8 ratones por tratamiento para garantizar que el estudio tenía capacidad para detectar diferencias en la variable de respuesta al nivel de confianza de 0,05.

#### Administración del fármaco

Se les administraron a los ratones las dosis especificadas de PBS, anticuerpo anti-G-CSF o control de isotipo (tal como se explica resumidamente en la sección 1) una vez al día (60 minutos antes del primer humo), administradas mediante inyección i.p.

#### Infección por virus

Se infectan los ratones expuestos a humo de cigarrillos (tal como se describió anteriormente) con una cepa de virus influenza no letal, adaptada a ratones [Mem71, H3N1] a una dosis conocida (en ratones normales) para producir replicación productiva e inflamación, pero no enfermedad manifiesta. Se diseccionaron los ratones 3d y 10d tras la infección por virus influenza. Los ratones control reciben una preparación de células no infectadas usadas para hacer crecer el virus.

#### Lavado broncoalveolar (LBA)

Se realizó LBA en ratones anestesiados de manera terminal. En resumen, se lavaron los pulmones de cada ratón *in situ* con una alícuota de 400  $\mu$ l, seguido por tres de 300  $\mu$ l de PBS, recuperándose aproximadamente 1 ml de líquido de lavado broncoalveolar (LLBA) de cada animal. La exposición a humo no tuvo ningún efecto sobre el volumen recuperado. Se determinó el número total de células viables en el LLBA usando los fluoróforos bromuro de etidio y naranja de acridina (Molecular Probes, San Diego, EE.UU.) en un hemocitómetro Neubauer convencional usando un microscopio de fluorescencia Axioscope de Zeiss. Se realizaron preparaciones para Cytospin usando 200  $\mu$ l de LLBA a 350 rpm durante 10 min en una centrífuga Cytospin 3 (Shandon, RU). Se tiñeron las preparaciones para Cytospin con DiffQuik (Dade Baxter, Australia) y se identificaron y diferenciaron las células en células mononucleares, epiteliales, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos mediante criterios morfológicos convencionales. Se contó un mínimo de 500 células por portaobjetos.

#### Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA)

Se midieron las concentraciones de TNF $\alpha$  en muestras de LLBA usando kits de ELISA Pharmingen OptEIA (marca comercial) según las instrucciones del fabricante. Se leyeron las absorbancias a 450 nm (contador multimarca Victor 1420, Wallac) y se analizaron usando el programa Microplate Manager (marca registrada) (BioRad, EE.UU.), que obtuvo la curva patrón y las absorbancias de las muestras.

#### Expresión y actividad de proteasas en el LLBA

Se usó zimografía para evaluar la expresión de proteasas. En resumen, se combinó LLBA de animales en cada grupo de tratamiento y se concentró añadiendo 250  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 50% v/v a 500  $\mu$ l de muestras combinadas de LLBA y se dejó a 4°C durante la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras (13.000 rpm durante 10 min, a 4°C) y se lavó el sedimento dos veces con 300  $\mu$ l de dietil éter al 80% (en etanol al 20% v/v) y se secó al aire durante 10 min. Entonces se resuspendió el sedimento en 50  $\mu$ l de 1 x tampón no reductor, se calentó durante 10 min a 65°C y se cargaron 20  $\mu$ l en minigeles de SDS-page. Se prepararon los minigeles de SDS-page (al 10% v/v) con la incorporación de gelatina (2 mg/ml) antes de la colada. Se corrió el LLBA (20  $\mu$ l) en los geles a un voltaje constante de 200 V en condiciones no reductoras. Cuando el frente de colorante alcanzó el fondo, se retiraron los geles y se lavaron dos veces durante 15 min en Triton X-100 al 2,5% v/v y se incubaron a 37°C durante la noche en tampón de zimografía (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM y NaN<sub>3</sub> al 0,01% v/v). Entonces se tiñeron los geles durante 45 min con azul brillante de Coomassie R-250 y se decoloraron ampliamente. Tras la decoloración, aparecieron zonas de actividad enzimática transparentes frente al fondo de azul de Coomassie.

También se sometió a prueba LLBA puro para determinar la actividad gelatinasa neta y la serina proteasa neta usando gelatina conjugada con fluorescencia (Molecular Probes, EE.UU.) y N-metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilida (Sigma, EE.UU.), respectivamente. Se diluyó el sustrato de gelatina (10 µg) en Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,01% v/v y se incubó a temperatura ambiente durante 16 h con 100 µl de LLBA puro. El sustrato digerido tenía máximos de absorción/emisión a 495 nm/515 nm. Se diluyó el sustrato de N-metoxisuccinil-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilida (50 µg) en Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,01% y se incubó a temperatura ambiente durante 16 h con 100 µl de LLBA puro. El sustrato digerido tenía máximos de absorción a 405 nm. Se midió la intensidad de fluorescencia de los sustratos en un lector de microplacas (Victor II, Wallac) para detectar diferencias cuantitativas en la actividad.

#### 10 Quantificación de virus

Se extrajeron pulmones completos de 4 ratones por grupo de tratamiento y se pesaron. Se homogeneizaron los ratones en medio de mantenimiento, con pulsos de 2x15 s, seguido por una centrifugación de aclarado a baja velocidad. Entonces se usaron diluciones en serie de homogeneizado de pulmón en ensayos de placas tal como se describió anteriormente (Youil, J Virol Methods 120(1):23-31, 2004) y se expresaron los títulos virales como ufp/g de pulmón

#### 20 Histología

Para garantizar la conservación morfológica de los pulmones, se sacrificaron los ratones mediante sobredosis de anestesia intraperitoneal (5,6 mg de ketamina/1,12 mg de xilacina) y luego se fijaron mediante perfusión a través de una cánula traqueal con formaldehído al 4% v/v a presión de H<sub>2</sub>O de exactamente 200 mm. Tras 1 h, se ligó la tráquea, se extrajeron los pulmones del tórax y se sumergieron en formaldehído al 4% v/v durante un periodo mínimo de 24 h. Tras la fijación del tejido pulmonar y el procesamiento en cera de parafina, se cortaron secciones (3 - 4 µm de grosor) transversalmente a través del lóbulo izquierdo. Se tiñeron las secciones con hematoxilina y eosina (H&E) para examen de histopatología general.

#### 30 Análisis estadísticos

Como los datos estaban distribuidos de manera normal, se presentan como datos agrupados expresados como media ± error estándar de la media (e.e.m.); *n* representa el número de ratones. Se determinaron las diferencias en los tipos celulares de LLBA y fórmulas leucocitarias totales mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por prueba a posteriori de Dunnett para comparaciones múltiples, cuando era apropiado. En algunos casos, se usó una prueba de la *t* de Student para datos independientes para determinar si había diferencias significativas entre medias de pares. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism (marca comercial) para Windows (versión 3.03). En todos los casos, se consideró que niveles de probabilidad inferiores a 0,05 (\**P*<0,05) indicaban significación estadística.

#### 40 **Ejemplo 1**

##### Fundamento y diseño del estudio

Éste es un modelo de inflamación de pulmón aguda donde el lipopolisacárido (LPS) instilado induce inflamación neutrofílica intensa. La cinética detallada y el uso de anticuerpos anti-GM-CSF en este sistema modelo se han publicado previamente (Bozinovski *et al*, J Biol Chem 277(45):42808-42814, 2002; Bozinovski *et al*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286(4):L877-885, 2004). En las condiciones descritas a continuación, la inflamación en este modelo es resistente al tratamiento con el glucocorticoesteroide dexametasona (Bozinovski *et al*, J Proteome Res 4(1):136-145, 2005).

##### *Diseño experimental*

Se trataron ratones con o bien control de isotipo o bien 250 µg/dosis i.p. de αG-CSF a *t* = -3 horas, se expusieron a una dosis de LPS a *t* = 0 y entonces se diseccionaron 24 horas después (figura 1).

55 (i) Grupos: Control – sin tratamiento

Solución salina

60 LPS

LPS + isotipo (IgG1 de rata, GL113)

65 LPS + αG-CSF (αG-CSF de rata, MAB414)

Solución salina + isotipo (IgG1 de rata, GL113)

Solución salina +  $\alpha$ G-CSF ( $\alpha$ G-CSF de rata, MAB414)

5 (ii) Criterios de valoración:

Líquido de LBA	-recuento total/fórmula leucocitaria -ELISA (TNF alfa) -zimografía (inducción de proteasa) -actividad proteasa
Sangre	-frotis de sangre -recuento total/fórmula leucocitaria
Pulmones completos	-congelados instantáneamente y combinados para cada grupo

10 Los datos son de recuentos de células en sangre y en líquido de LBA, gráficos de resultados de ELISA, gráficos de actividad proteasa y geles de zimografía. También se han guardado muestras de pulmón combinadas y muestras de líquido de LBA congeladas.

(iii) Ratones: Ratones Balb/c macho; 6 semanas de edad; aproximadamente 20 gramos

15 8/grupo

56 ratones suministrados por ARC, Perth.

(iv) Formulación de fármaco:

20 *Compuesto de prueba: anticuerpo  $\alpha$ G-CSF ( $\alpha$ G-CSF)*

Especificidad: G-CSF de ratón (neutraliza la actividad de G-CSF)

25 Clase de Ig: IgG1 de rata

Fuente: R&D Systems

Número de catálogo: MAB414

30 Clon: 67604

Nivel de endotoxinas: <0,1 UE por 1  $\mu$ g de AcM, suministrado por R&D.

35 Formulación: Suministrada como una disolución filtrada por 0,2  $\mu$ M en PBS a 9,95 mg/ml. Diluida hasta 1,0 mg/ml con PBS libre de endotoxinas estéril. Almacenada como alícuotas de 5 mg (5 ml), a -20°C.

Dosificación: 250  $\mu$ g/inyección/ratón, i.p.

40 *Compuesto de prueba: anticuerpo control de isotipo (isotipo)*

Especificidad:  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*

Clase de Ig: IgG1 de rata

45 Fuente: Walter and Eliza Hall Institute Monoclonal Antibody Lab

Clon: GL113

50 Nivel de endotoxinas: <0,1 UE por 1  $\mu$ g de AcM, suministrado por WEHI.

Formulación: Suministrada como disolución estéril en PBS a 1,3 mg/ml. Diluida hasta 1,0 mg/ml con PBS libre de endotoxinas estéril. Almacenada en alícuotas de 5 mg (5 ml), a -20°C.

Dosificación: 250  $\mu$ g/inyección/ratón, i.p.

Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre el número de células inflamatorias en el LLBA de ratones tratados con LPS

5 Anticuerpo  $\alpha$ G-CSF, control de isotipo o PBS (solución salina) no aumentaron el número de células inflamatorias en el LLBA de animales tratados con solución salina (figuras 2a a d).

LPS produjo un aumento significativo en el número total de células (figura 2a), neutrófilos (figura 2c) y linfocitos (figura 2d) en el LLBA. El control de isotipo no tuvo ningún efecto sobre el número de células inflamatorias.

10 En cambio,  $\alpha$ G-CSF produjo una disminución significativa en el número total de células y el número de neutrófilos y linfocitos, pero no de macrófagos, en animales tratados con LPS (figura 2).

Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre los niveles proteicos de TNF $\alpha$ , en el LLBA de ratones tratados con LPS, tal como se determina mediante ELISA

15 Se detectó muy poco TNF $\alpha$  en el LLBA de animales tratados con solución salina o LPS en el punto de tiempo de 24 horas (figura 3). Sin embargo, parecía que  $\alpha$ G-CSF produjo un marcado aumento en los niveles de TNF $\alpha$  en el LLBA de ratones tratados con LPS.

Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre la expresión y actividad de proteasas en el LLBA de ratones tratados con LPS, tal como se determina mediante zimografía y ensayos de proteasa

20 El tratamiento con LPS produjo un marcado aumento en la expresión de MMP9 (figura 4a) y la actividad proteasa (figuras 4b y c) en el LLBA de ratones. Sin embargo, no hubo ningún efecto de o bien control de isotipo o bien  $\alpha$ G-CSF sobre la expresión o actividad de proteasas inducidas por LPS.

Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre el número de células inflamatorias en sangre de ratones tratados con LPS

30 LPS produjo un aumento significativo en el número de células viables totales, macrófagos y neutrófilos en la sangre de ratones tratados.  $\alpha$ G-CSF produjo una reducción significativa en el número de neutrófilos en animales tratados con LPS, pero no afectó al número de macrófagos o células viables totales. Obsérvese que no se detectaron linfocitos en la sangre de ninguno de los animales.

**Ejemplo 2**

35 Humo subcrónico

40 En este modelo, se expusieron ratones a humo (o se manipularon de manera simulada) 3 veces al día (2 cigarrillos/exposición) durante 4 días, y se analizaron el quinto día, tal como se describió previamente (Chen *et al*, *Neuropsychopharmacology* 30(4), 713-719 2005).

Diseño experimental:

45 Se expusieron ratones a humo de cigarrillo durante 4 días, 3 veces al día. Se trataron los ratones con o bien control de isotipo o bien 250  $\mu$ g/dosis i.p. de  $\alpha$ G-CSF a t=d-1 y d2, y luego se diseccionaron en el día 5. Las condiciones de exposición a humo fueron tal como se describió previamente (Vlahos *et al*, *Am JPhysiol Lung Cell Mol Physiol* 290(5):L931-945, 2006). En resumen, los ratones recibieron humo de 3 cigarrillos durante 1 h y esto se realizó tres veces al día durante hasta 4 días. Se usaron cigarrillos con filtro disponibles comercialmente (fabricados por Philip Morris, Australia) de la siguiente composición: 16 mg o menos de alquitrán, 1,2 mg o menos de nicotina y 15 mg o menos de CO. Se generó humo en volúmenes tidales de 50 ml a lo largo de 10 s usando una velocidad de quemado del cigarrillo y un volumen de inhalación de humo normales que imitan la aspiración programada (figura 6).

(i) Grupos: Simulado (manipulado, pero sin exposición a humo)

55 Simulado + isotipo (IgG1 de rata, GL113)

Simulado +  $\alpha$ G-CSF ( $\alpha$ G-CSF de rata, MAB414)

Humo solo

60 Humo + isotipo (IgG1 de rata, GL113)

Humo +  $\alpha$ G-CSF ( $\alpha$ G-CSF de rata, MAB414)

65 (ii) Criterios de valoración:

Líquido de LBA	-recuento total/fórmula leucocitaria -ELISA (TNF alfa) -zimografía (inducción de proteasa) -actividad proteasa
Sangre	-frotis de sangre -recuento total/fórmula leucocitaria
Pulmones completos	-congelados instantáneamente y combinados para cada grupo

5 Los datos son de recuentos de células en sangre y en líquido de LBA, gráficos de resultados de ELISA, gráficos de actividad proteasa y geles de zimografía. También se han guardado muestras de pulmón combinadas y muestras de líquido de LBA congeladas.

(iii) Ratones requeridos: 8/grupo de 48 ratones (descritos anteriormente)

10 (iv) Formulación de fármaco:

*Compuesto de prueba: anticuerpo  $\alpha$ G-CSF (descrito anteriormente)*

*Compuesto de prueba: anticuerpo control de isotipo (descrito anteriormente)*

15 *Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre el número de células inflamatorias en el LLBA de ratones expuestos a humo*

El anticuerpo  $\alpha$ G-CSF no aumentó el número de células inflamatorias en el LLBA de ratones expuestos de manera simulada (figura 7).

20 La exposición a humo de 4 días produjo un aumento significativo en el número de macrófagos (figura 7b), neutrófilos (figura 7c) y linfocitos (figura 7d), así como en el número total de células (figura 7a), en el LLBA de ratones.

25 El control de isotipo redujo el número total de células y el número de macrófagos y neutrófilos en el LLBA de ratones expuestos a humo, mientras que  $\alpha$ G-CSF produjo una reducción significativa en el número de macrófagos, neutrófilos y células totales, y una marcada reducción en el número de linfocitos en el LLBA.

*Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre los niveles proteicos de TNF $\alpha$ , en el LLBA de ratones expuestos a humo, tal como se determina mediante ELISA*

30 Mientras que hubo niveles bajos de TNF $\alpha$  detectable en el LLBA de animales tratados de manera simulada (figura 8), la exposición a humo de cigarrillos produjo un marcado aumento en los niveles de TNF $\alpha$ . El control de isotipo produjo una ligera reducción y  $\alpha$ G-CSF produjo una reducción significativa en los niveles de TNF $\alpha$  en el LLBA de ratones expuestos a humo.

35 *Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre la expresión y actividad de proteasas en el LLBA de ratones expuestos a humo, tal como se determina mediante zimografía y ensayos de proteasa*

40 Hubo un aumento significativo en la expresión de MMP9 en el LLBA de ratones expuestos a humo que se redujo mediante  $\alpha$ G-CSF pero no mediante control de isotipo (figura 9a).

En cambio, no hubo ningún aumento significativo en la actividad o bien gelatinasa (figura 9b) o bien serina proteasa (figura 9c) tras la exposición a humo. No hubo ningún efecto apreciable del control de isotipo o  $\alpha$ G-CSF sobre la actividad serina proteasa, aunque  $\alpha$ G-CSF parecía producir un aumento significativo en la actividad gelatinasa.

45 *Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre el número de células inflamatorias en sangre de ratones expuestos a humo*

50 La exposición a humo produjo un aumento significativo en el número de neutrófilos en la sangre, en comparación con los animales tratados de manera simulada. Obsérvese que no se detectaron linfocitos en la sangre de ninguno de los animales.

El control de isotipo produjo una reducción significativa en el número total de células y el número de macrófagos en la sangre de animales expuestos a humo, mientras que el anticuerpo  $\alpha$ G-CSF produjo una reducción significativa en el número total de células, neutrófilos y macrófagos en animales expuestos a humo.

**Ejemplo 3**

Estudio con humo y virus influenza (exacerbación)

5 Diseño experimental:

Se expusieron ratones a humo de cigarrillo durante 4 días, 3 veces al día (día -5 a día -2). Entonces se infectaron los ratones con virus influenza (cepa A de virus influenza Mem-71 derivado de células MDCK) o diluyente (preparación de células MDCK no infectadas) el día 0. Se trataron ratones con o bien control de isotipo o bien 250 µg/dosis i.p. de αG-CSF a t=d-1 y d2, y luego se diseccionaron en el día 3 o el día 10.

(i) Grupos:

- 15 1. Control - sin tratamiento (x 2)
- 2. Diluyente (x 2)
- 3. Diluyente + isotipo (x 2)
- 20 4. Diluyente + αG-CSF (x2)
- 5. Influenza (x 2)
- 25 6. Influenza + isotipo (x 2)
- 7. Influenza + αG-CSF (x 2)

(ii) Criterios de valoración: únicamente)

Líquido de LBA	-recuento total/fórmula leucocitaria -ELISA (TNF alfa) -zimografía (inducción de proteasa) -actividad proteasa
Sangre	-frotis de sangre -recuento total/fórmula leucocitaria
Pulmones completos	-cuantificación viral en pulmones -pulmones fijados con PFA para histología (grupos 1, 5, 6, 7 únicamente) -congelados instantáneamente y combinados para cada grupo

30 Los datos son de recuentos de células en sangre y en líquido de LBA, gráficos de resultados de ELISA, títulos virales en pulmones, gráficos de actividad proteasa y geles de zimografía. Se han facilitado los resultados de histología de pulmón cuantitativos y cortes de histología para los grupos control y tratado con virus influenza en ambos puntos de tiempo. También se han guardado muestras de pulmón combinadas y muestras de líquido de LBA congeladas.

(iii) Ratones requeridos: 12/grupo (es decir, 8 para BAL y 4 para titulación viral en pulmones completos)

40 4 ratones adicionales/grupo en los grupos 1, 5, 6, 7 para histología  
184 ratones (tal como se describe en la sección 1.1)

(iv) Formulación de fármaco:

45 *Compuesto de prueba: anticuerpo αG-CSF (descrito anteriormente)*  
*Compuesto de prueba: anticuerpo control de isotipo (descrito anteriormente)*

50 Efecto del anticuerpo αG-CSF sobre el número de células inflamatorias en el LLBA de ratones tratados con virus influenza y ratones expuestos a humo

En el día 3 tras la infección (figura 12), la exposición a humo de cigarrillos produjo un marcado aumento en el número total de células (figura 12a) y en el número de macrófagos (figura 12b) y linfocitos (figura 12d) en el LLBA, que estaba adicionalmente elevado, junto con el número de neutrófilos (figura 12c), por la infección por virus influenza de ratones expuestos a humo.

5 El control de isotipo no tuvo ningún efecto sobre el número total de células ni el número de macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el LLBA de ratones expuestos a humo, tratados con virus influenza.

10 Sin embargo,  $\alpha$ G-CSF produjo una reducción significativa en el número total de células y el número de macrófagos y neutrófilos, y una marcada reducción en el número de linfocitos en el LLBA de animales expuestos a humo y tratados con virus influenza.

15 En el día 10 tras la infección (figura 13), la exposición a humo de cigarrillos no produjo un marcado aumento en el número de células inflamatorias en el LLBA. Sin embargo, la infección por virus influenza de ratones expuestos a humo produjo un marcado aumento en todas las células inflamatorias en el LLBA (figuras 13a-d) que estaban ligeramente aumentadas mediante tratamiento con control de isotipo, pero marcadamente disminuidas mediante tratamiento con anticuerpo  $\alpha$ G-CSF.

20 Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre los niveles proteicos de  $TNF\alpha$ , en el LLBA de ratones tratados con virus influenza y expuestos a humo, tal como se determina mediante ELISA

25 La exposición a humo de cigarrillos produjo un marcado aumento en los niveles de  $TNF\alpha$  de LLBA en el día 3 y el día 10 (figura 14). El virus influenza produjo una reducción en el  $TNF\alpha$  de LLBA en el día 3 tras la infección que se redujo adicionalmente mediante  $\alpha$ G-CSF (figura 14a).

En el día 10 tras la infección, el virus influenza produjo un pequeño aumento en el  $TNF\alpha$  de LLBA en ratones expuestos a humo que sólo se redujo ligeramente mediante tratamiento con  $\alpha$ G-CSF (figura 14b).

30 El control de isotipo produjo ligeras reducciones en los niveles de  $TNF\alpha$  tanto en el día 3 como en el día 10 que no fueron tan marcadas como con el tratamiento con anticuerpo  $\alpha$ G-CSF.

Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre la expresión y actividad de proteasas en el LLBA de ratones tratados con virus influenza y expuestos a humo, tal como se determina mediante zimografía y ensayos de proteasa

35 En el día 3 tras la infección, el humo de cigarrillos produjo un ligero aumento en la expresión de MMP9 (figura 15a) y la actividad gelatinasa (figura 15c). La actividad gelatinasa se elevó adicionalmente con la infección por virus influenza. Esta elevación en los niveles y la actividad de proteasas se redujo con el tratamiento con  $\alpha$ G-CSF.

40 En el día 10 tras la infección, el humo de cigarrillos produjo una reducción en los niveles de MMP9 en el LLBA (figura 15b). La infección por virus influenza aumentó los niveles de MMP9 y la actividad gelatinasa (figura 15c) en el LLBA de ratones expuestos a humo en el día 10, y esta elevación en los niveles y la actividad de proteasas se redujo con  $\alpha$ G-CSF.

45 No hubo ningún efecto de o bien la exposición a humo de cigarrillos o bien la infección por virus influenza sobre la actividad serina proteasa en el LLBA en el día 3 o el día 10 (figura 15e y f) y, por tanto, ningún efecto apreciable de  $\alpha$ G-CSF.

Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre el número de células inflamatorias en sangre de ratones tratados con virus influenza y expuestos a humo

50 En el día 3 tras la infección (figura 16), el humo de cigarrillos produjo un marcado aumento en las células inflamatorias en la sangre que aumentó significativamente tras la exposición a virus influenza (el número de macrófagos se elevó marcadamente tras la infección por virus influenza).  $\alpha$ G-CSF produjo una reducción significativa en el número de neutrófilos en la sangre de animales expuestos a humo e infectados por virus influenza (figura 16c), y una marcada reducción en el número total de células en la sangre.  $\alpha$ G-CSF tuvo poco efecto sobre el número de macrófagos en la sangre de ratones expuestos a humo, infectados por virus influenza.

60 En el día 10 tras la infección (figura 17), la infección por virus influenza produjo un aumento significativo en el número total de células, macrófagos y neutrófilos en la sangre de ratones expuestos a humo.  $\alpha$ G-CSF produjo una reducción significativa en el número de neutrófilos y una marcada reducción en el número de macrófagos y células totales en la sangre de ratones expuestos a humo e infectados por virus influenza

Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre los títulos virales en los pulmones de ratones tratados con virus influenza y expuestos a humo

65

$\alpha$ G-CSF produjo una marcada reducción en los títulos virales en ratones expuestos a humo e infectados por virus influenza, en comparación con ratones tratados con isotipo (figura 18) en el día 3 tras la infección. No se detectó virus en ninguno de los grupos de tratamientos en el día 10 tras la infección.

5 Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre el reclutamiento de células inflamatorias en tejido pulmonar de ratones tratados con virus influenza y expuestos a humo, tal como se determina mediante análisis histológicos

Se tomaron muestras de pulmones fijados con PFA de ratones control, ratones tratados con virus influenza + expuestos a humo y ratones tratados virus influenza + humo + anticuerpo  $\alpha$ G-CSF y se montaron en parafina y se  
10 tiñeron para revelar cambios estructurales y celulares en el parénquima, la vasculatura y los bronquios pulmonares. Se tomaron imágenes usando un microscopio Zeiss a 10X y 20x. Las imágenes tomadas tanto en el día 3 como en el día 10 de una región peribronquial en el pulmón izquierdo mostraron que el humo y el virus influenza produjeron una marcada potenciación de la inflamación reconocida como infiltración de la región entre los vasos sanguíneos y los bronquios con células mononucleares, neutrófilos y linfocitos. También fue evidente la infiltración del parénquima.  
15 En comparación con el control de isotipo, el anticuerpo  $\alpha$ G-CSF redujo marcadamente el grado de inflamación en todas las regiones.

**Ejemplo 4**

20 Humo subcrónico

En este modelo, se expusieron ratones a humo (o se manipularon de manera simulada) 3 veces al día (2 cigarrillos/exposición) durante 4 días, y se analizaron el quinto día, tal como se describió anteriormente (Chen *et al*, Neuropsychopharmacology 30(4):713-719, 2005). Se trataron ratones con o bien control de isotipo o bien 85  $\mu$ g t.n. o bien 250  $\mu$ g i.p. de anti-GCSF a t=d-1 y d+2.  
25

Diseño experimental:

Se expusieron ratones a humo de cigarrillo durante 4 días, 3 veces al día. Se trataron los ratones con o bien control de isotipo (250  $\mu$ g/dosis i.p. o 85  $\mu$ g/dosis t.n.) o bien anticuerpo anti-GCSF (250  $\mu$ g/dosis i.p. o 85 $\mu$ g/dosis t.n.) a t=d-1 y d2, y luego se diseccionaron en el día 5. Las condiciones de exposición a humo fueron tal como se describió previamente (Vlahos *et al*, citado anteriormente 2006). En resumen, los ratones recibieron humo de 3 cigarrillos durante 1 h y esto se realizó tres veces al día durante hasta 4 días. Se usaron cigarrillos con filtro disponibles comercialmente (fabricados por Philip Morris, Australia) de la siguiente composición: 16 mg o menos de alquitrán, 1,2 mg o menos de nicotina y 15 mg o menos de CO. Se generó humo en volúmenes tidales de 50 ml a lo largo de 10 s usando una velocidad de quemado del cigarrillo y volumen de inhalación de humo normales que imitan la aspiración programada.  
30  
35

(i) Grupos:

- 40
1. Simulado (manipulado pero sin exposición a humo)
  2. Humo solo
  - 45 3. Humo + isotipo por vía transnasal (85  $\mu$ g = 50  $\mu$ l a 1,7 mg/ml) (IgG1 de rata, GL113)
  4. Humo + anti-GCSF por vía transnasal (85  $\mu$ g = 50  $\mu$ l a 1,7 mg/ml) (anti-GCSF de rata, MAB414)
  5. Humo + isotipo mediante inyección i.p. (250  $\mu$ g) (IgG1 de rata, GL113)
  - 50 6. Humo + anti-GCSF mediante inyección i.p. (250  $\mu$ g) (anti-GCSF de rata, MAB414)

(ii) Criterios de valoración:

Líquido de LBA	-recuento total/fórmula leucocitaria -ELISA (TNF alfa) -zimografía (inducción de proteasa)
Sangre	-recuento total/fórmula leucocitaria
Pulmones completos	-congelados instantáneamente y combinados para cada grupo

55 Nota: Se proporcionaron los siguientes gráficos: gráficos de recuentos de células en sangre y en líquido de LBA, gráficos de resultados de ELISA y geles de zimografía. Las muestras de líquido de LBA congeladas y muestras de

pulmón combinadas se enviaron al cliente.

(iii) Ratones requeridos:

5 8/grupo

48 ratones

(iv) Formulación de fármaco:

- 10 *Compuesto de prueba: anticuerpo  $\alpha$ G-CSF*  
 Especificidad: G-CSF de ratón (neutraliza la actividad de G-CSF)
- 15 Clase de Ig: IgG1 de rata  
 Fuente: R&D Systems
- 20 Número de catálogo: MAB414  
 Clon: 67604  
 Nivel de endotoxinas: <0,1 UE por 1  $\mu$ g de AcM, suministrado por R&D.
- 25 Formulación: Suministrada como una disolución filtrada por 0,2  $\mu$ M en PBS a 9,95 mg/ml. Diluida hasta 1,0 mg/ml con PBS libre de endotoxinas estéril: Proporcionada como alícuotas de 5 mg (5 ml), almacenada a -20°C.  
 Dosificación: 250  $\mu$ g/inyección/ratón, i.p. o 85  $\mu$ g/transnasal/ratón, t.n.
- 30 *Compuesto de prueba: anticuerpo control de isotipo*  
 Especificidad:  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*
- 35 Clase de Ig: IgG1 de rata  
 Fuente: Walter and Eliza Hall Institute Monoclonal Antibody Lab  
 Clon: GL113
- 40 Nivel de endotoxinas: <0,1 UE por 1  $\mu$ g de AcM, suministrado por WEHI. Formulación: Suministrada como una disolución estéril en PBS a 1,3 mg/ml. Diluida hasta 1,0 mg/ml con PBS libre de endotoxinas estéril. Proporcionada en alícuotas de 5 mg (5 ml); almacenada a -20°C.  
 Dosificación: 250  $\mu$ g/inyección/ratón, i.p. o 85  $\mu$ g/transnasal/ratón, t.n.
- 45 *Efecto del anticuerpo  $\alpha$ G-CSF sobre el número de células inflamatorias en el LLBA de ratones expuestos a humo*  
 La exposición a humo de 4 días produjo un aumento significativo en células viables totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el LLBA en comparación con el grupo simulado (figura 19).
- 50 El anticuerpo  $\alpha$ G-CSF administrado por vía transnasal produjo una reducción significativa en células viables totales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el LLBA en comparación con el grupo de isotipo administrado por vía transnasal.
- 55 El anticuerpo  $\alpha$ G-CSF administrado mediante inyección intraperitoneal produjo una reducción significativa en células viables totales y neutrófilos, pero no tuvo ningún efecto sobre el número de macrófagos o linfocitos, en el LLBA en comparación con el grupo de isotipo (i.p.).
- 60 **Ejemplo 5**  
*Inhibición de la proliferación mediada por G-CSF en células BaF3 que expresan el receptor de hG-CSF mediante diversos antagonistas de G-CSF*  
 Se cultivaron células BaF3 transfectadas de manera estable con hG-CSFR tal como se describe por Layton *et al*, citado anteriormente 1997, en placas de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en medio DMEM con FBS al 5% y rh o
- 65

mGCSF 0,5 ng/ml (R&D Sytems, n.º de catálogo 214-CS y n.º de catálogo 414-CS, respectivamente). Se añadieron antagonistas de G-CSF (MAB414, AcM711 anti-hG-CSFR y hG-CSFR-Fc de R&D Systems) a tres veces las dosis de titulación comenzando a partir de 1 µM y se midió la proliferación celular mediante reducción con MTS (Cory *et al*, Cancer Commun. 3:207-12, 1991; Riss y Moravec, citado anteriormente 1993) tras 48 horas cultivo.

- 5 A. Inhibición mediante anticuerpo anti-G-CSF:
- Un anticuerpo MAB414 comercial de R&D Systems pudo inhibir la proliferación de mG-CSF con una  $CI_{50}$  de 10 pM.
- 10 B. Inhibición mediante anticuerpo anti-hG-CSFR:
- Un anticuerpo monoclonal murino contra el receptor de hG-CSF, AcM711, (Layton *et al*, citado anteriormente 1997) y su derivado humanizado pudieron inhibir la proliferación de mG-CSF con  $CI_{50}$  de 1,1 nM y 1,5 nM, respectivamente.
- 15 Un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de AcM711 y las regiones constantes de cadenas pesadas y ligeras de la IgG1 humana inhibieron la actividad de G-CSF con una  $CI_{50}$  similar a la del anticuerpo monoclonal murino AcM711.
- 20 C. Inhibición mediante proteína hG-CSFR-Fc soluble:
- Una proteína G-CSFR-Fc soluble (Honjo *et al*, Acta Cryst F61:788-790, 2005) pudo inhibir la proliferación de mG-CSF con una  $CI_{50}$  de 22 pM.
- 25 Estos resultados demuestran que la actividad biológica de G-CSF puede inhibirse mediante una variedad de antagonistas, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos frente a G-CSF, anticuerpos frente a G-CSFR y receptores de G-CSF solubles.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas a las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de cualquiera de dos o más de dichas etapas o características que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

### 35 Bibliografía

- Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994
- 40 Barnes, N Engl J Med 343(4):269-280, 2000
- Barnes *et al*, Eur Respir J 22:672-688, 2003
- Barnes, Cytokine Growth Factor Rev 14(6):511-522, 2003
- 45 Beeh y Beier, Clin Exp Allergy 26(2):142-157, 2006
- Bird, Science 242:423, 1988
- 50 Bozinovski *et al*, J Biol Chem 277(45):42808-42814, 2002
- Bozinovski *et al*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286(4):L877-885, 2004
- Bozinovski *et al*, J Proteome Res 4(1):136-145, 2005
- 55 Brennan *et al*, Science 229:81, 1985
- Bungart *et al*, British Journal of Haematology 22:1156, 1990
- 60 Carter *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. 89:4285 1992
- Carter *et al*, Bio/Technology 10:163-167, 1992
- Chen *et al*, Neuropsychopharmacology 30(4), 713--719 2005
- 65 Clackson *et al*, Nature 352:624-628, 1991

- Colotta *et al*, Blood 80:2012-2020, 1992
- 5 Cory *et al*, Cancer Commun. 3:207-212, 1991
- de Haan *et al*, Blood 86:2986-2992, 1995
- Demetri *et al*, Blood 78:2791-2808, 1991
- 10 Di Stefano *et al*, Am J Respir Crit Care Med 158(4):1277-1285, 1998
- Patente EP n.º 0 216 846
- Patente EP n.º 0 256 055
- 15 Patente EP n.º 0 323 997
- Solicitud de patente EP n.º 89303964,4
- 20 Geng *et al*, Molecular Immunology 44:5121-529, 2007
- Gericke *et al*, Journal of Leukocyte Biology 57:455-461, 1995
- Honjo *et al*, Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun. 61(Pt 8):788-90, 2005
- 25 Honjo *et al*, Acta Cryst F61:788-790, 2005
- Huston *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988
- 30 Jacob *et al*, Blood 92:353-361, 1998
- Jones *et al*, Nature 321:522-525, 1986
- Kabat *et al*. en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., US Department of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991
- 35 Keatings *et al*, Am J Respir Crit Care Med 153(2):530-534, 1996
- Kohler y Milstein, Nature 256:495-499, 1975
- 40 Kortt *et al*, Protein Engineering 10:423, 1997
- Larrick *et al*, Bio/Technology 7:934, 1989
- 45 Layton *et al*, J. Biol. chem. 272:29735-29741, 1997
- Layton *et al*, Growth Factors 14:117-130, 1997
- Liu *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439, 1987
- 50 Lopez y Murray, Nat Med 4(11):1241-1243, 1998
- Lord *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9499-9503, 1989
- 55 Marks *et al*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991
- Morimoto *et al*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117,1992
- Morrison *et al*, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984
- 60 Nicola *et al*, Journal of Biological Chemistry 258:9017, 1983
- Nicola *et al*, Nature 314:625, 1985
- 65 Metcalf, International Journal of Cancer 25:225, 1980

- Padlan *et al*, Mol. Immunol. 28:489- 498, 1991
- Pedersen *et al*, J. Mol. Biol. 235:959-973, 1994
- 5 Pesci *et al*, Eur Respir J. 12(2):380-386, 1998
- Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992
- Reichmann *et al*, Nature 332:323-329, 1988
- 10 Retamales *et al*, Am J Respir Crit Care Med 164:469-473, 2001
- Rex *et al*, Transfusion 35:605-611, 1995
- 15 Riss y Moravec, Mol. Cell Biol. 3(1):184a, 1993
- Roberts *et al*, Sangre 89:2736-2744, 1997
- Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; ADN Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, D. N. Glover ed. 1985
- 20 Sommerhoff *et al*, J Clin Invest 85(3):682-289, 1990
- 25 Souza *et al*, Science 232:61, 1986
- Stanescu *et al*, Thorax 51(3):267-271, 1996
- Stockely, Am J Respir Crit Care Med 160(5 Pt 2):S49-52, 1999
- 30 Stockley, Chest 121(5 Supl.):151S-155S, 2002
- Summerton y Weller, Antisense and Nucleic Acid Drug Development 7:187-195, 1997
- 35 Tomizuka *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727, 2000.
- Patente estadounidense n.º 4.399.216
- Patente estadounidense n.º 4.740.461
- 40 Patente estadounidense n.º 4.816.567
- Patente estadounidense n.º 4.912.040
- 45 Patente estadounidense n.º 4.946.778
- Patente estadounidense n.º 4.959,455
- Patente estadounidense n.º 5.223.409
- 50 Patente estadounidense n.º 5.403.484
- Patente estadounidense n.º 5.427.908
- 55 Patente estadounidense n.º 5.476.996
- Patente estadounidense n.º 5.571.698
- Patente estadounidense n.º 5.698.767
- 60 Patente estadounidense n.º 5.580.717
- Patente estadounidense n.º 5.589.456
- 65 Patente estadounidense n.º 5.939.598

- Patente estadounidense n.º 5.885.793
- Patente estadounidense n.º 5.969.108
- 5 Patente estadounidense n.º 6.075.181
- Patente estadounidense n.º 6.114.598
- 10 Patente estadounidense n.º 6.150.584
- Patente estadounidense n.º 6.162.963
- Patente estadounidense n.º 6.172.197
- 15 Patente estadounidense n.º 6.521.404
- Patente estadounidense n.º 6.544.731
- 20 Patente estadounidense n.º 6.555.313
- Patente estadounidense n.º 6.582.915
- Patente estadounidense n.º 6.593.081
- 25 Vlahos *et al*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290(5):L931-945, 2006 Ward *et al*, Nature 334:544, 1989
- Welte *et al*, Blood 88:1907-1929, 1996
- Winter & Harris, TIPS 14:139, 1993
- 30 Documento WO 1993/02108
- Documento WO 1999/55369
- 35 Documento WO2004/006955
- Xu *et al*, British Journal of Haematology 93:558-568, 1996
- Yong *et al*, European Journal of Haematology 49:251-259, 1992
- 40 Yong, British Journal of Haematology 94:40-47, 1996
- Youil, J Virol Methods 120(1):23-31, 2004
- 45 **Lista de secuencias**
- <110> CSL LIMITED David, Eric, CRUMP (EE.UU. ÚNICAMENTE) Andrew, Donald NASH (EE.UU. ÚNICAMENTE)
- <120> TRATAMIENTO DE ESTADOS PATOLÓGICOS PULMONARES
- 50 <130> 30277984/EJH
- <150> Documento AU 2006904378
- <151> 11-08-2006
- 55 <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.4
- 60 <210> 1
- <211> 204
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 65 <400> 1

ES 2 506 065 T3

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro  
 20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu  
 35 40 45

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys  
 50 55 60

Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu  
 65 70 75 80

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser  
 85 90 95

Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu  
 100 105 110  
 Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu  
 115 120 125

Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala  
 130 135 140

Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu  
 145 150 155 160

Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg  
 165 170 175

Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu  
 180 185 190

Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 195 200

<210> 2  
 5 <211> 1498  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

10

ES 2 506 065 T3

ggagcctgca gccagcccc acccagaccc atggctggac ctgccacca gagccccatg 60  
 aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc 120  
 acccccctgg gccctgccag ctcccctgcc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa 180  
 gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag 240  
 ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc 300  
 ctgagcagct gccccagcca gccctgcag ctggcagget gcttgagcca actccatagc 360  
 ggccctttcc tctaccaggg gtcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt 420  
 cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag 480  
 atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg cagcccaccc agggtgccat gccggccttc 540  
 gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg gtccctagttg cctcccctct gcagagcttc 600  
 ctggaggtgt cgtaccgctt tctacgccac cttgccccagc cctgagccaa gccctcccca 660  
 tcccatgtat ttatctctat ttaatattta tgtctattta agcctcatat ttaaagacag 720  
 ggaagagcag aacggagccc caggcctctg tgccttccc tgcatttctg agtttcattc 780  
 tcctgcctgt agcagtgaga aaaagctcct gtccctccat ccctggact gggaggtaga 840  
 taggtaaaata ccaagtattt atfactatga ctgctcccca gccctggctc tgcaatgggc 900  
 actgggatga gccgctgtga gccctggtc ctgaggggtcc ccacctggga cccttgagag 960  
 taccaggtct cccacgtggg agacaagaaa tcctgttcta atatttaaac agcagtgttc 1020  
 cccatctggg tccttgacc cctcactctg gcctcagccg actgcacagc ggccccctgca 1080  
 tccccttggc tgtgaggccc ctggacaagc agaggtggcc agagctggga ggcattggccc 1140  
 tggggctcca cgaatttgct ggggaatctc gtttttcttc ttaagacttt tgggacatgg 1200  
 tttgactccc gaacatcacc gacgcgtctc ctgtttttct ggggtggcctc gggacacctg 1260  
 ccctgcccc acgagggta ggaactgtgac tcttttttag gccaggcagg tgccctggaca 1320  
 tttgccttgc tggacgggga ctggggatgt gggagggagc agacaggagg aatcatgtca 1380  
 ggctgtgtg tgaaggaag ctccactgtc accctccacc tcttcacccc ccaactacca 1440  
 gtgtcccctc cactgtcaca ttgtaactga acttcaggat aataaagtgc ttgcctcc 1498

<210> 3  
 <211> 525  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

10

ES 2 506 065 T3

acccccctgg gccctgccag ctccctgccc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa 60  
 gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag 120  
 ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc 180  
 ctgagcagct gccccagcca ggcctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc 240  
 ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt 300  
 cccacctggg acacactgca gctggacgct gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag 360  
 atggaagaac tgggaatggc cctgcacctg cagcccacc agggtgccat gccggccttc 420  
 gcctctgctt tccagcgccg ggcaggaggg gtctagttg cctcccatct gcagagcttc 480  
 ctggagggtg cgtaccgctg tctacgccac cttgcccagc cctga 525

<210> 4  
 <211> 174  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

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

10

<210> 5  
 <211> 863

ES 2 506 065 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

ES 2 506 065 T3

Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val  
 210 215 220

Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu  
 225 230 235 240

Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp  
 245 250 255

Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro  
 260 265 270

Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu  
 275 280 285

Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr  
 290 295 300

Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp  
 305 310 315 320

Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val  
 325 330 335

Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val  
 340 345 350

Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile  
 355 360 365

Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile  
 370 375 380

Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro  
 385 390 395 400

Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr  
 405 410 415

Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu  
 420 425 430

ES 2 506 065 T3

Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly  
 435 440 445

Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly  
 450 455 460

Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu  
 465 470 475 480

Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro  
 485 490 495

Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met  
 500 505 510

Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser  
 515 520 525

His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln  
 530 535 540

Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr  
 545 550 555 560

His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala  
 565 570 575

Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro  
 580 585 590

Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala  
 595 600 605

Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser  
 610 615 620

Glu Leu His Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr  
 625 630 635 640

Cys Leu Cys Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys Ser Pro Asn Arg Lys Asn  
 645 650 655

ES 2 506 065 T3

Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala His Ser Ser Leu Gly Ser  
660 665 670

Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Leu Pro Gly Pro Arg Gln Gly Gln  
675 680 685

Trp Leu Gly Gln Thr Ser Glu Met Ser Arg Ala Leu Thr Pro His Pro  
690 695 700

Cys Val Gln Asp Ala Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile  
705 710 715 720

Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp  
725 730 735

Glu Ser His Asn Ser Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln  
740 745 750

Thr Tyr Val Leu Gln Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln  
755 760 765

Ser Gln Ser Gly Thr Ser Asp Gln Val Leu Tyr Gly Gln Leu Leu Gly  
770 775 780

Ser Pro Thr Ser Pro Gly Pro Gly His Tyr Leu Arg Cys Asp Ser Thr  
785 790 795 800

Gln Pro Leu Leu Ala Gly Leu Thr Pro Ser Pro Lys Ser Tyr Glu Asn  
805 810 815

Leu Trp Phe Gln Ala Ser Pro Leu Gly Thr Leu Val Thr Pro Ala Pro  
820 825 830

Ser Gln Glu Asp Asp Cys Val Phe Gly Pro Leu Leu Asn Phe Pro Leu  
835 840 845

Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly Met Glu Ala Leu Gly Ser Phe  
850 855 860

<210> 6  
<211> 3024  
5 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 506 065 T3

gaagctggac tgcagctggt ttcaggaact tctcttgacg agaagagaga ccaaggaggc 60  
 caagcagggg ctgggccaga ggtgccaaca tggggaaact gaggctcggc tcggaaaggt 120  
 gaagtaactt gtccaagatc acaaagctgg tgaacatcaa gttggtgcta tggcaaggct 180  
 gggaaactgc agcctgactt gggctgcctt gatcatcctg ctgctccccg gaagtctgga 240  
 ggagtggggg cacatcagtg tctcagcccc catcgtccac ctgggggatc ccatcacagc 300  
 ctctgcatac atcaagcaga actgcagcca tctggaccgg gagccacaga ttctgtggag 360  
 actgggagca gagcttcagc ccgggggagc gcagcagcgt ctgtctgatg ggaccagga 420  
 atctatcatc accctgcccc acctcaacca cactcagccc tttctctcct gctgcctgaa 480  
 ctggggcaac agcctgcaga tctggacca ggttgagctg cgcgcaggct accctccagc 540  
 cataccccac aacctctcct gcctcatgaa cctcacaacc agcagcctca tctgccagtg 600  
 ggagccagga cctgagacc cctaccacac cagcttcaact ctgaagagtt tcaagagccg 660  
 gggcaactgt cagacccaag gggactccat cctggactgc gtgcccaagg acgggcagag 720  
 ccactgctgc atcccacgca aacacctgct gttgtaccag aatatgggca tctgggtgca 780  
 ggcagagaat gcgctgggga ccagcatgtc cccacaactg tgtcttgatc ccatggatgt 840  
 tgtgaaactg gagccccca tctgctggac catggacccc agccctgaag cggcccctcc 900  
 ccaggcaggc tgcctacagc tgtgctggga gccatggcag ccaggcctgc acataaatca 960  
 gaagtgtgag ctgcgccaca agccgcagcg tggagaagcc agctgggcac tgggtggccc 1020  
 cctccccttg gaggcccttc agtatgagct ctgcgggctc ctcccagcca cggcctacac 1080  
 cctgcagata cgctgcatac gctggccctt gcctggccac tggagcgact ggagccccag 1140  
 cctggagctg agaactaccg aacgggcccc cactgtcaga ctggacacat ggtggcggca 1200  
 gaggcagctg gaccccagga cagtgcagct gttctggaag ccagtgcccc tggaggaaga 1260  
 cagcggacgg atccaaggtt atgtggttctc ttggagaccc tcaggccagg ctggggccat 1320  
 cctgcccctc tgcaacacca cagagctcag ctgcacctc cacctgcctt cagaagccca 1380  
 ggaggtggcc cttgtggcct ataactcagc cgggacctct cgccccaccc cgggtgtctt 1440  
 ctcagaaagc agaggccag ctctgaccag actccatgcc atggcccag accctcacag 1500  
 cctctgggta ggctgggagc cccccaatcc atggcctcag ggctatgtga ttgagtgggg 1560

ES 2 506 065 T3

cctgggcccc cccagcgcga gcaatagcaa caagacctgg aggatggaac agaatgggag 1620  
agccacgggg tttctgctga aggagaacat caggcccttt cagctctatg agatcatcgt 1680  
gactcccttg taccaggaca ccatgggacc ctcccagcat gtctatgcct actctcaaga 1740  
aatggetccc tcccatgccc cagagctgca tctaaagcac attggcaaga cctgggcaca 1800  
gctggagtgg gtgcctgagc cccctgagct ggggaagagc ccccttacc actacacat 1860  
cttctggacc aacgctcaga accagtcctt ctccgccatc ctgaatgcct cctcccgtgg 1920  
ctttgtcctc catggcctgg agcccgcag tctgtatcac atccacctca tggctgccag 1980  
ccaggtctgg gccaccaaca gtacagtcct caccctgatg accttgacce cagaggggtc 2040  
ggagctacac atcatcctgg gctgttcgg cctcctgctg ttgctcacct gcctctgtgg 2100  
aactgcctgg ctctgttgca gcccacacag gaagaatccc ctctggccaa gtgtcccaga 2160  
cccagctcac agcagcctgg gctcctgggt gccacaatc atggaggagc tgcccggacc 2220  
cagacagga cagtggctgg ggcagacatc tgaatgagc cgtgctctca ccccatcc 2280  
ttgtgtgcag gatgccttc agctgcccgg ccttggcacg ccacctca ccaagctcac 2340  
agtgtggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag tccataaca gctcagagac 2400  
ctgtggcctc cccactctgg tccagaccta tgtgctccag ggggaccaa gagcagttc 2460  
caccagccc caatcccagt ctggcaccag cgatcaggtc ctttatgggc agctgctggg 2520  
cagccccaca agcccagggc cagggcacta tctccgctgt gactccaetc agcccctctt 2580  
ggcgggcctc acccccagcc ccaagtccta tgagaacetc tggttccagg ccagcccctt 2640  
ggggaccctg gtaaccocag cccaagcca ggaggacgac tgtgtctttg ggccactgct 2700  
caactcccc ctctgcagg ggatccgggt ccatgggatg gaggcgctgg ggagcttcta 2760  
gggttctctg gggttccctt cttgggctg cctcttaaag gcctgagcta gctggagaag 2820  
aggggagggg ccataagccc atgactaaaa actaccccag cccaggtct caccatctcc 2880  
agtcaccagc atctccctct cctcccaatc tccataggct gggcctcca ggcgatctgc 2940  
atactttaag gaccagatca tgctccatcc agccccacce aatggccttt tgtgctgtt 3000  
tctataact tcagtattgt aaac 3024

<210> 7  
<211> 2520  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

ES 2 506 065 T3

gagtgcgggc acatcagtgt ctcagccccc atcgtccacc tgggggatcc catcacagcc 60  
 tcctgcatca tcaagcagaa ctgcagccat ctggaccggg agccacagat tctgtggaga 120  
 ctgggagcag agcttcagcc cgggggcagg cagcagcgtc tgtctgatgg gaccaggaa 180  
 tctatcatca cctgcecca cctcaaccac actcaggect ttctctctg ctgcctgaac 240  
 tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc ggcagggcta ccctccagcc 300  
 ataccacaca acctctctg cctcatgaac ctcacaacca gcagcctcat ctgccagtgg 360  
 gagccaggac ctgagaccca cctaccacc agcttcactc tgaagagttt caagagccgg 420  
 ggcaactgtc agaccaagg ggactccatc ctggactgcg tgcccaagga cgggcagagc 480  
 cactgctgca tcccacgcaa acacctgctg ttgtaccaga atatgggcat ctgggtgcag 540  
 gcagagaatg cgctggggac cagcatgtcc ccacaactgt gtcttgatcc catggatggt 600  
 gtgaaactgg agcccccat gctgaggacc atggaccca gccctgaagc ggccccctcc 660  
 caggcaggct gcctacagct gtgctgggag ccatggcagc caggcctgca cataaatcag 720  
 aagtgtgagc tgcgccaaa gccgcagcgt ggagaagcca gctgggact ggtgggcccc 780  
 ctccccctgg aggccttca gtatgagctc tgggggctcc tcccagccac ggectacacc 840  
 ctgcagatac gctgcatccg ctggccccctg cctggccact ggagcgactg gagccccagc 900  
 ctggagctga gaactaccga acgggcccc actgtcagac tggacacatg gtggcggcag 960  
 aggcagctgg accccaggac agtgcagctg ttctggaagc cagtgccctt ggaggaagac 1020  
 agcggacgga tccaaggtta tgtggtttct tggagacct caggccaggc tggggccatc 1080  
 ctgccccctt gcaacaaccac agagctcagc tgcaccttc acctgccttc agaagcccag 1140  
 gaggtggccc ttgtggccta taactcagcc gggaccttc gccccacccc ggtggtcttc 1200  
 tcagaaagca gaggccagc tctgaccaga ctccatgcca tggcccgaga ccctcacagc 1260  
 ctctgggtag gctgggagcc cccaatcca tggcctcagg gctatgtgat tgagtggggc 1320  
 ctgggcccc ccagcgcgag caatagcaac aagacctgga ggatggaaca gaatgggaga 1380  
 gccacggggg ttctgctgaa ggagaacatc aggcccttc agctctatga gatcatcgtg 1440  
 actcccttgt accaggacac catgggacc tcccagcatg tctatgccta ctctcaagaa 1500  
 atggtccct cccatgccc agagctgcat ctaaagcaca ttggcaagac ctgggcacag 1560

ES 2 506 065 T3

ctggagtggg tgctgagcc cctgagctg gggaagagcc cccttaccca ctacaccatc 1620  
 ttctggacca acgctcagaa ccagtccttc tccgccatcc tgaatgcctc ctcccgtggc 1680  
 tttgtcctcc atggcctgga gcccgccagt ctgtatcaca tccacctcat ggctgccagc 1740  
 caggctgggg ccaccaacag tacagtcctc accctgatga ccttgacccc agaggggtcg 1800  
 gagctacaca tcctcctggg cctgttcggc ctctgctgt tgctcacctg cctctgtgga 1860  
 actgcctggc tctgttgag cccaacagg aagaatcccc tctggccaag tgtcccagac 1920  
 ccagctcaca gcagcctggg ctctgggtg cccacaatca tggaggagct gcccgacccc 1980  
 agacagggac agtggctggg gcagacatct gaaatgagcc gtgctctcac cccacatcct 2040  
 tgtgtgcagg atgccttcca gctgccggc cttggcacgc caccatcac caagctcaca 2100  
 gtgctggagg aggatgaaaa gaagccggtg ccttgggagt ccataacag ctgagagacc 2160  
 tgtggcctcc cactctggt ccagacctat gtgctccagg gggacccaag agcagtttcc 2220  
 acccagcccc aatcccagtc tggcaccagc gatcaggtcc tttatgggca gctgctgggc 2280  
 agccccacaa gcccagggcc agggcactat ctccgctgtg actccactca gccctcttg 2340  
 ggggacctca ccccagccc caagtcctat gagaacctct ggttccaggc cagccccttg 2400  
 gggaccttgg taaccccagc ccaagccag gaggacgact gtgtctttgg gccactgctc 2460  
 aacttcccc tctgcaggg gatccgggtc catgggatgg aggcgctggg gagcttctag 2520

<210> 8  
 <211> 839  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp  
 1 5 10 15

Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp  
 20 25 30

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly  
 35 40 45

Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr  
 50 55 60

10

ES 2 506 065 T3

Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn  
65 70 75 80

Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly  
85 90 95

Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr  
100 105 110

Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu  
115 120 125

Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln  
130 135 140

Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser  
145 150 155 160

His Cys Cys Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly  
165 170 175

Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln  
180 185 190

Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu  
195 200 205

Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys  
210 215 220

Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln  
225 230 235 240

Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala  
245 250 255

Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly  
260 265 270

Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp  
275 280 285

ES 2 506 065 T3

Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg  
 290 295 300

Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln  
 305 310 315 320

Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro  
 325 330 335

Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg  
 340 345 350

Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu  
 355 360 365

Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu  
 370 375 380

Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe  
 385 390 395 400

Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg  
 405 410 415

Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro  
 420 425 430

Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn  
 435 440 445

Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe  
 450 455 460

Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val  
 465 470 475 480

Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala  
 485 490 495

Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys  
 500 505 510

ES 2 506 065 T3

His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro  
 515 520 525

Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn  
 530 535 540

Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly  
 545 550 555 560

Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu  
 565 570 575

Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu  
 580 585 590

Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser Glu Leu His Ile Ile Leu Gly Leu  
 595 600 605

Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr Cys Leu Cys Gly Thr Ala Trp Leu  
 610 615 620

Cys Cys Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp  
 625 630 635 640

Pro Ala His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu  
 645 650 655

Leu Pro Gly Pro Arg Gln Gly Gln Trp Leu Gly Gln Thr Ser Glu Met  
 660 665 670

Ser Arg Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Val Gln Asp Ala Phe Gln Leu  
 675 680 685

Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Glu  
 690 695 700

Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser Ser Glu Thr  
 705 710 715 720

Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln Gly Asp Pro  
 725 730 735

ES 2 506 065 T3

Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gly Thr Ser Asp Gln  
740 745 750

Val Leu Tyr Gly Gln Leu Leu Gly Ser Pro Thr Ser Pro Gly Pro Gly  
755 760 765

His Tyr Leu Arg Cys Asp Ser Thr Gln Pro Leu Leu Ala Gly Leu Thr  
770 775 780

Pro Ser Pro Lys Ser Tyr Glu Asn Leu Trp Phe Gln Ala Ser Pro Leu  
785 790 795 800

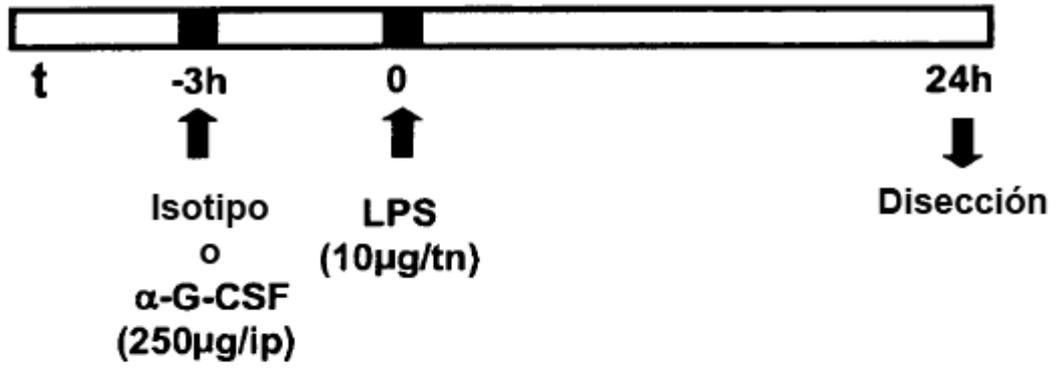
Gly Thr Leu Val Thr Pro Ala Pro Ser Gln Glu Asp Asp Cys Val Phe  
805 810 815

Gly Pro Leu Leu Asn Phe Pro Leu Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly  
820 825 830

Met Glu Ala Leu Gly Ser Phe  
835

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Agente que inhibe G-CSFR, en el que dicho agente es un anticuerpo específico para G-CSFR para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o una forma exacerbada de la misma en un sujeto.
2. Agente para su uso según la reivindicación 1, en el que la forma exacerbada es EPOC exacerbada aguda (EPOC-EA).
- 10 3. Agente para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el sujeto es un ser humano.
4. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente es para su uso con un agente terapéutico seleccionado de la lista que consiste en un agente antiinflamatorio, un broncodilatador y un antibiótico.
- 15 5. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 20 6. Agente para su uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
7. Agente para su uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 25 8. Uso de un agente que inhibe G-CSFR, en el que dicho agente es un anticuerpo específico para G-CSFR, en la fabricación de un medicamento para tratar enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o una forma exacerbada de la misma en un sujeto.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que la forma exacerbada es EPOC exacerbada aguda (EPOC-EA).
- 30 10. Uso según la reivindicación 8 ó 9, en el que el sujeto es un ser humano.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
- 35 13. Uso según la reivindicación 11, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.



**Figura 1**

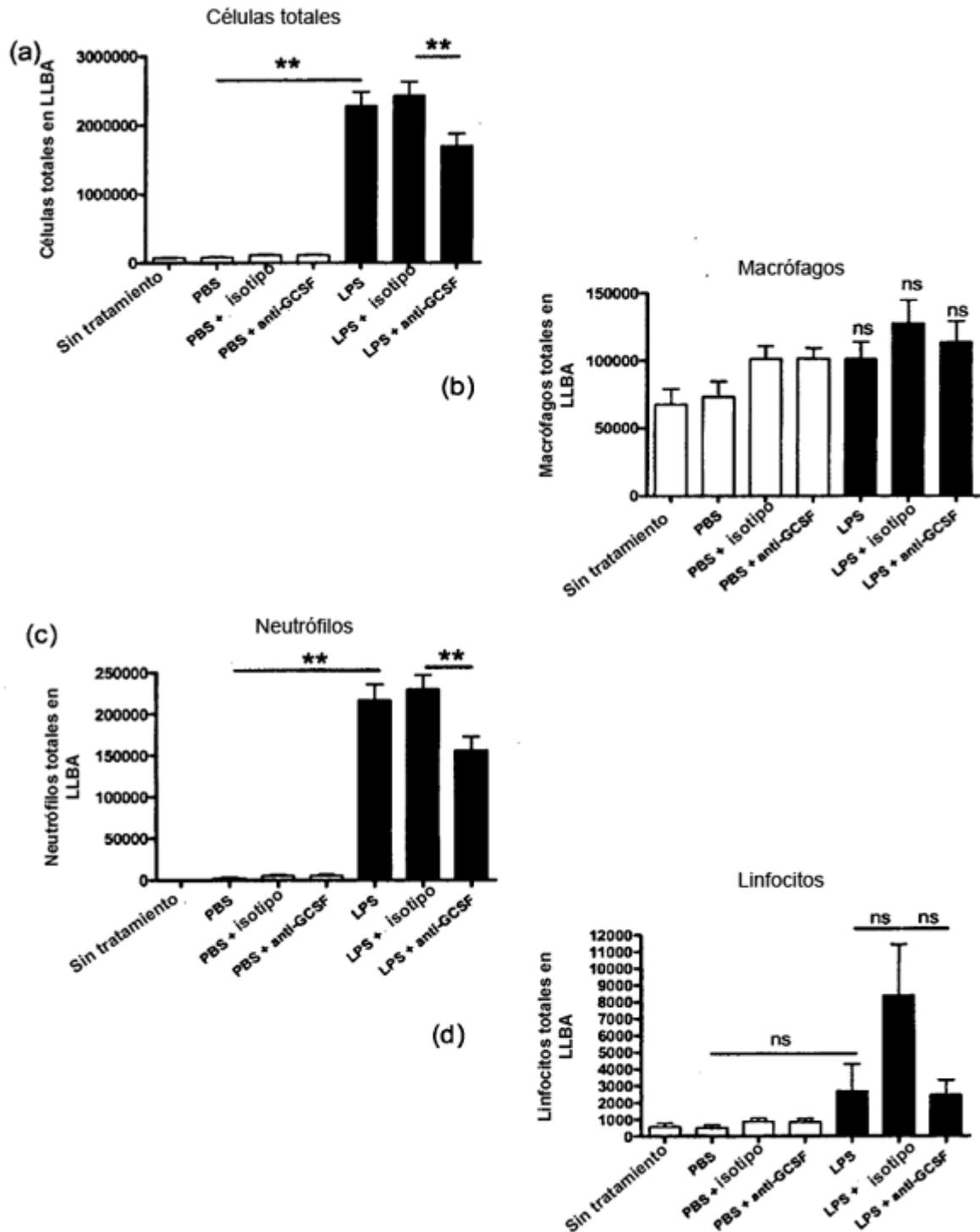
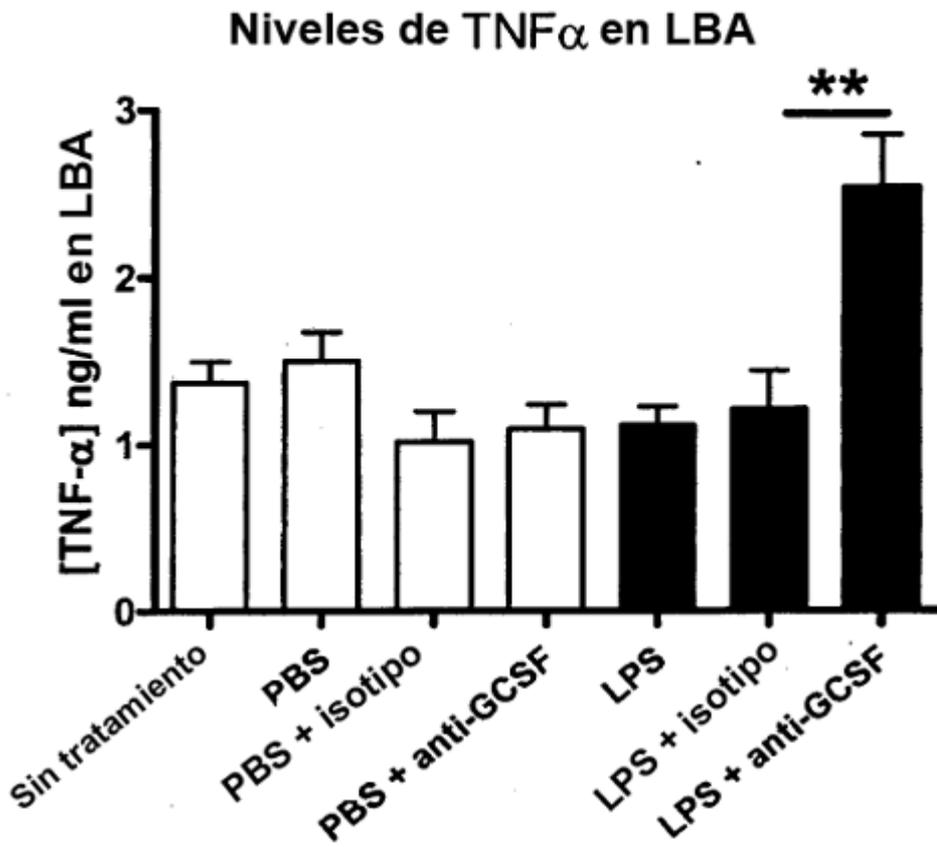


Figura 2



**Figura 3**

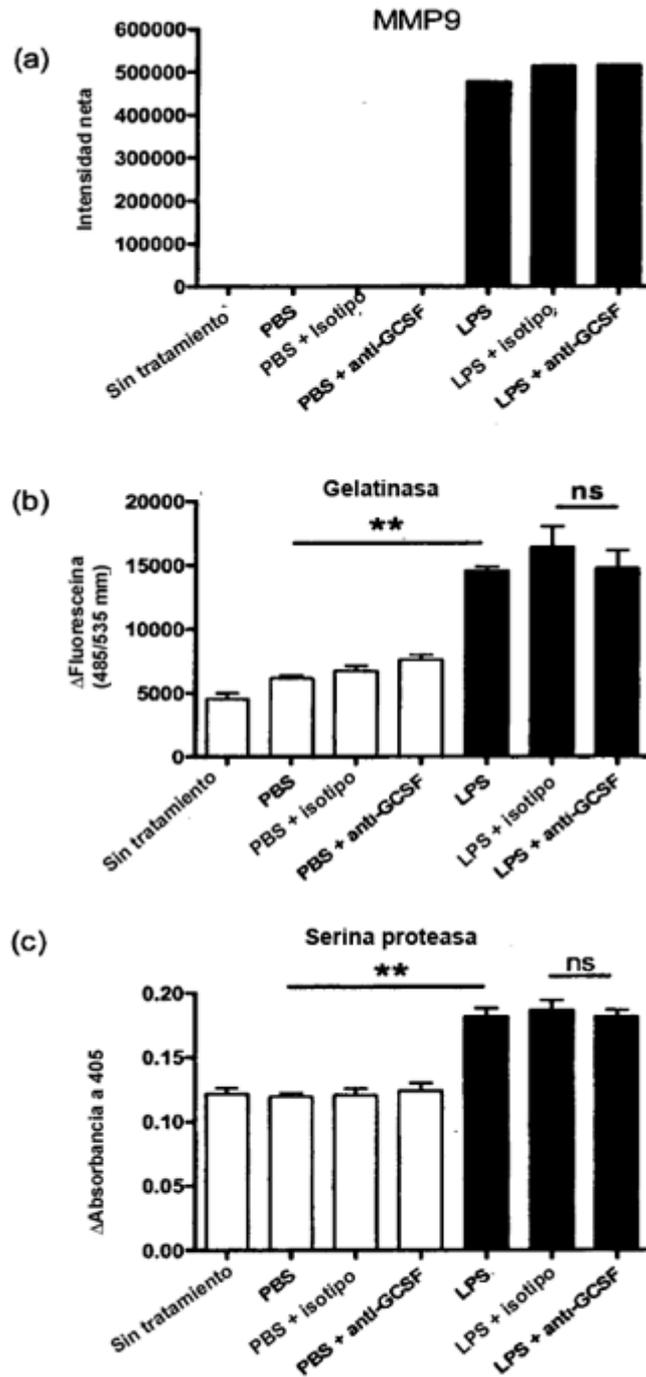


Figura 4

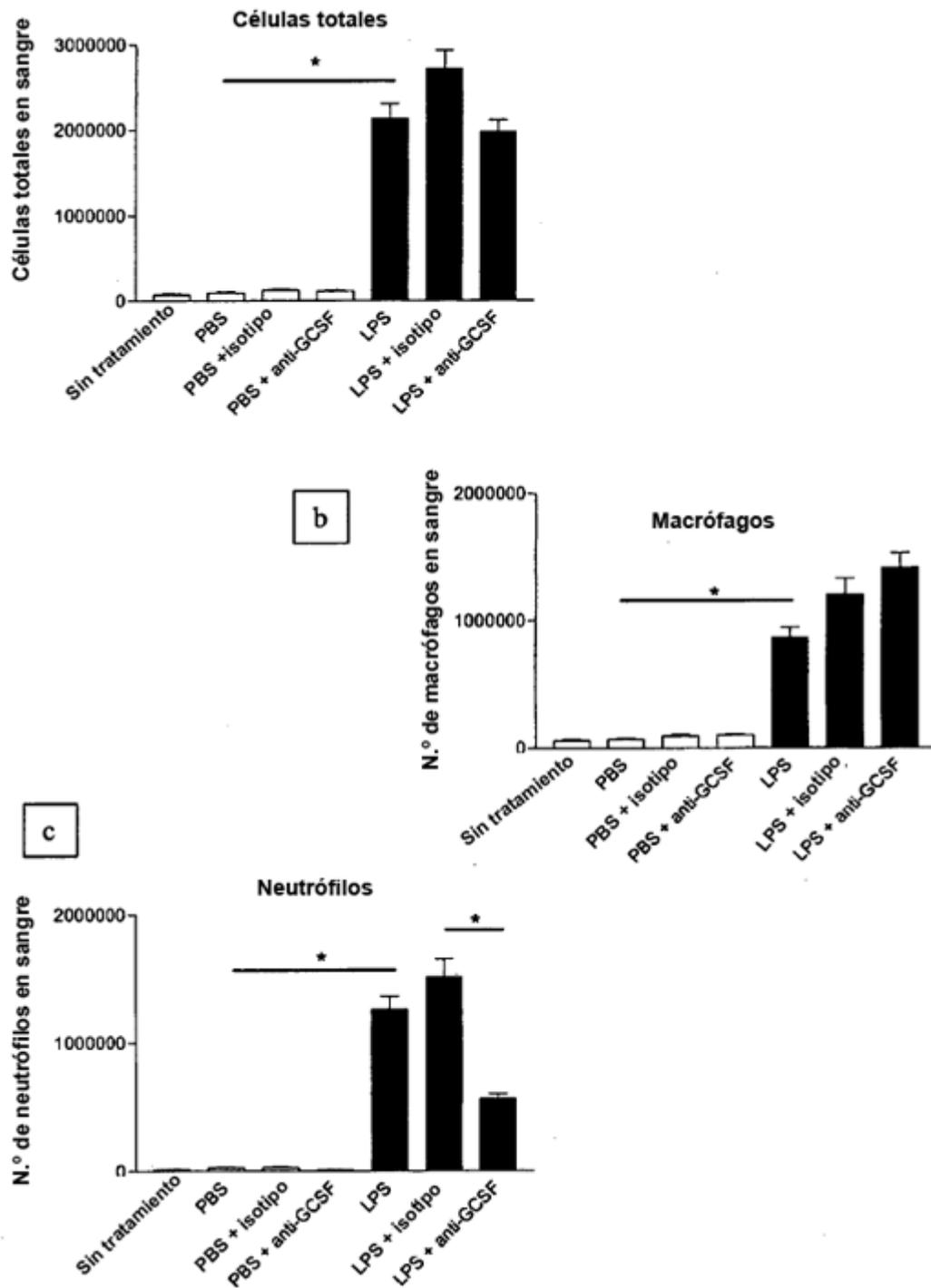
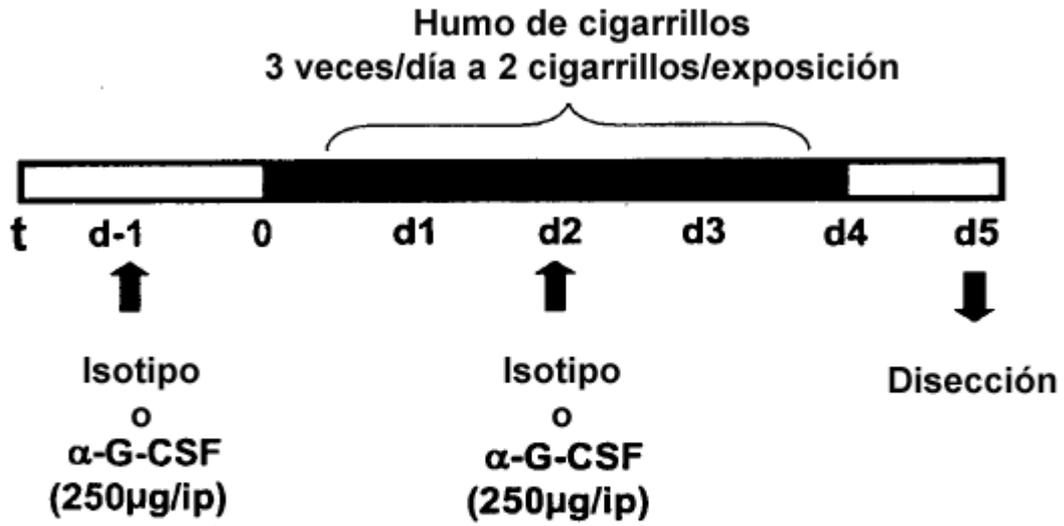


Figura 5



**Figura 6**

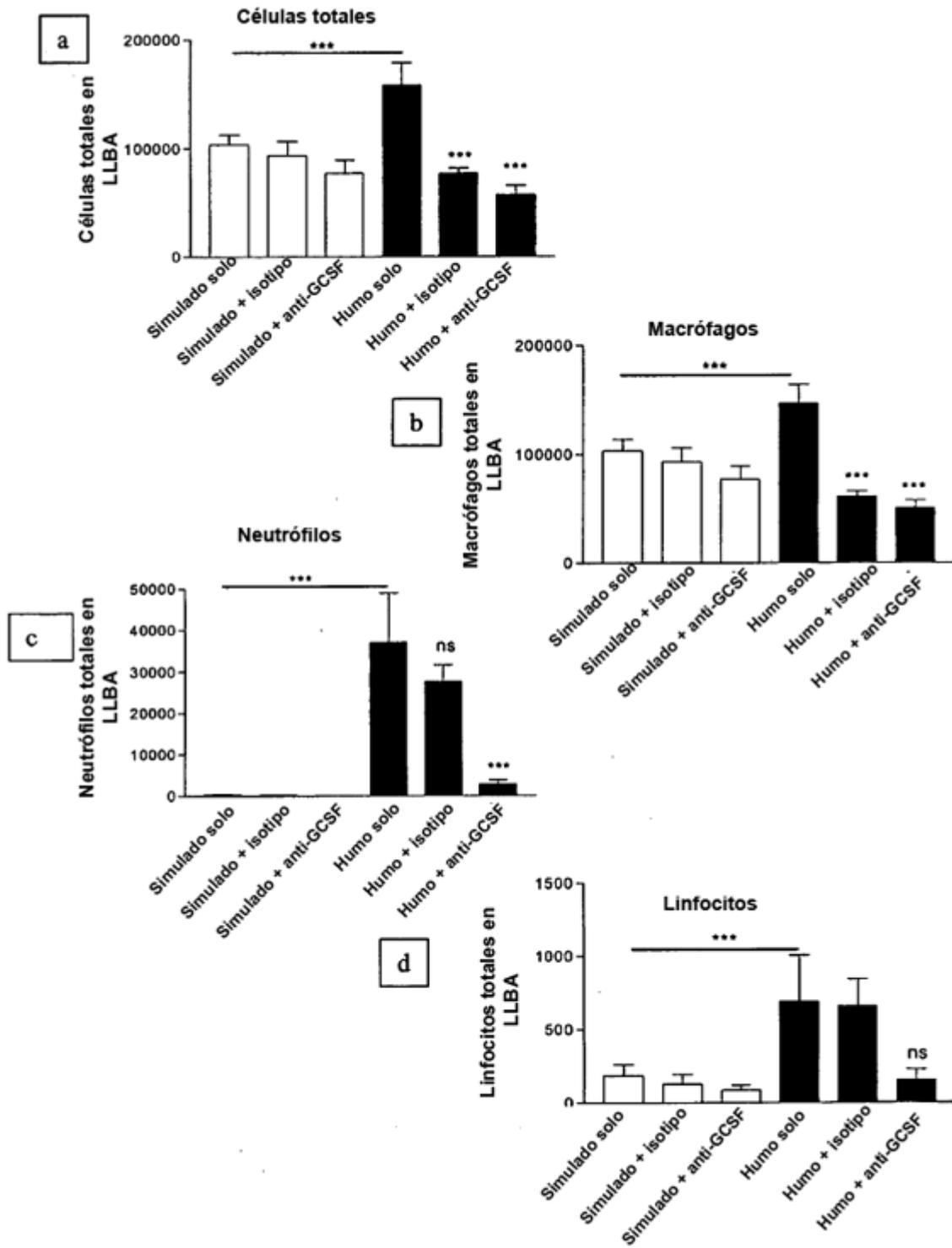
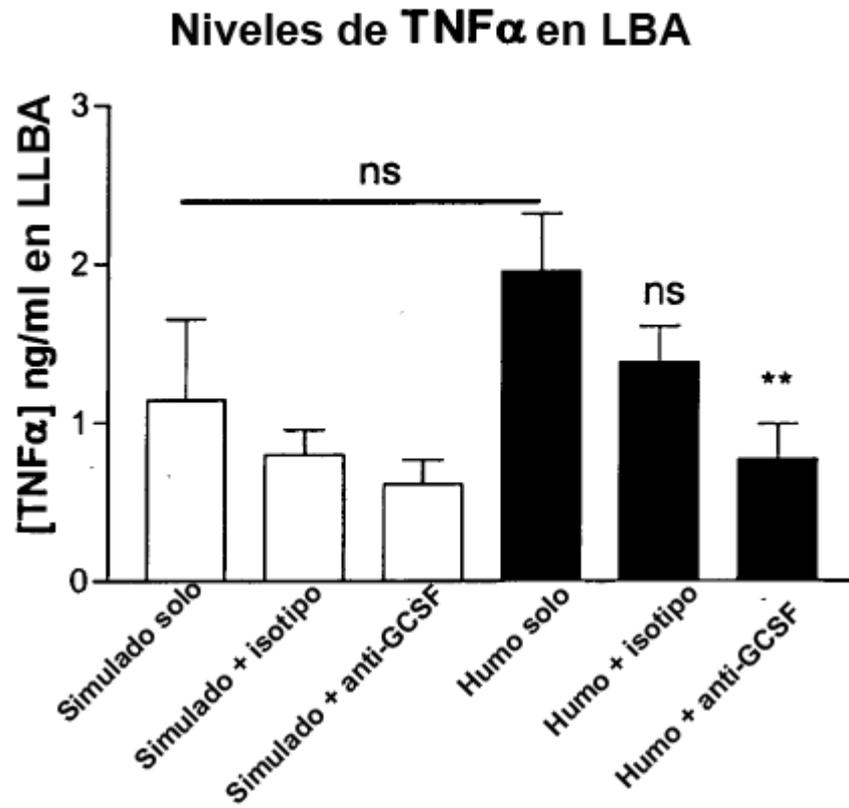


Figura 7



**Figura 8**

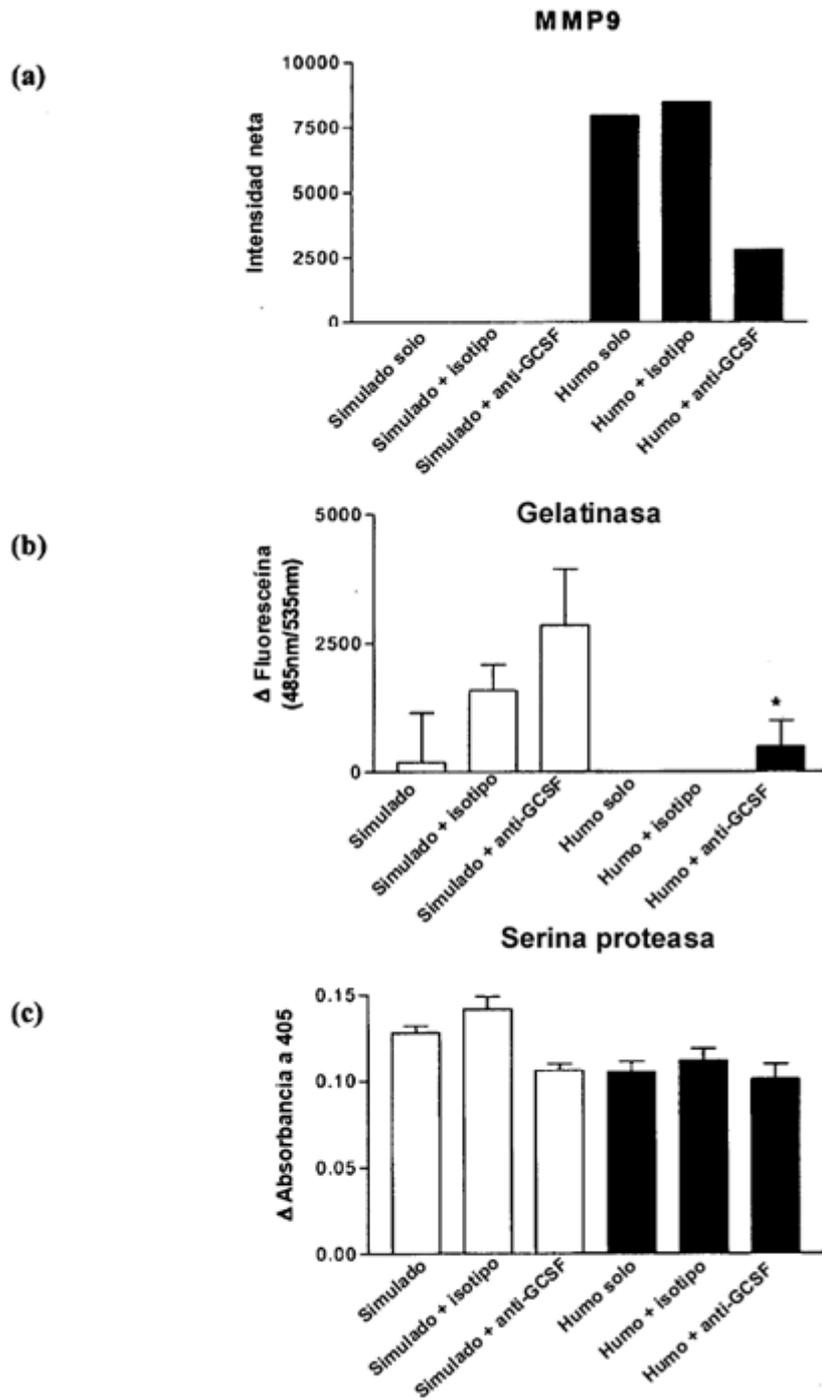


Figura 9

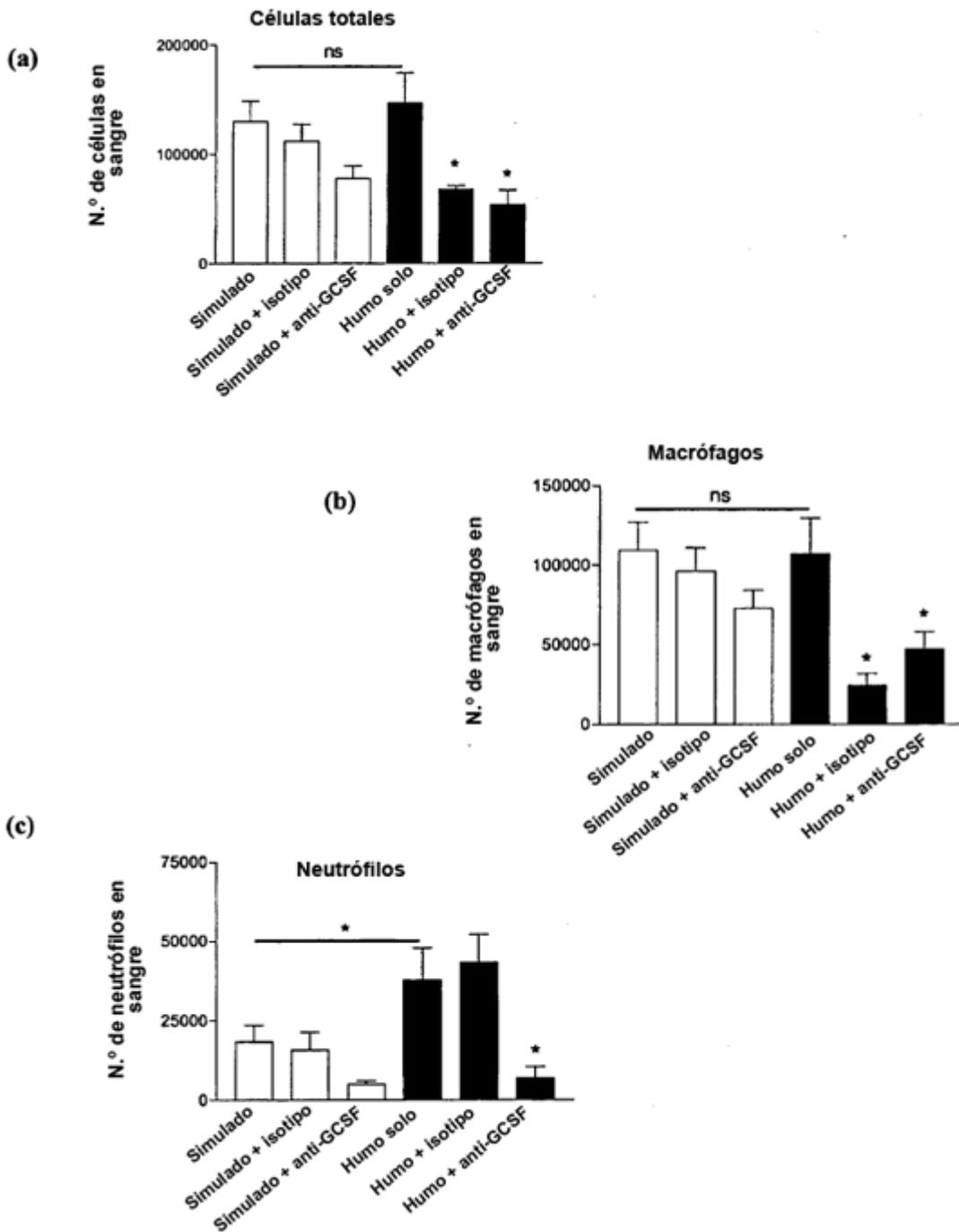


Figura 10

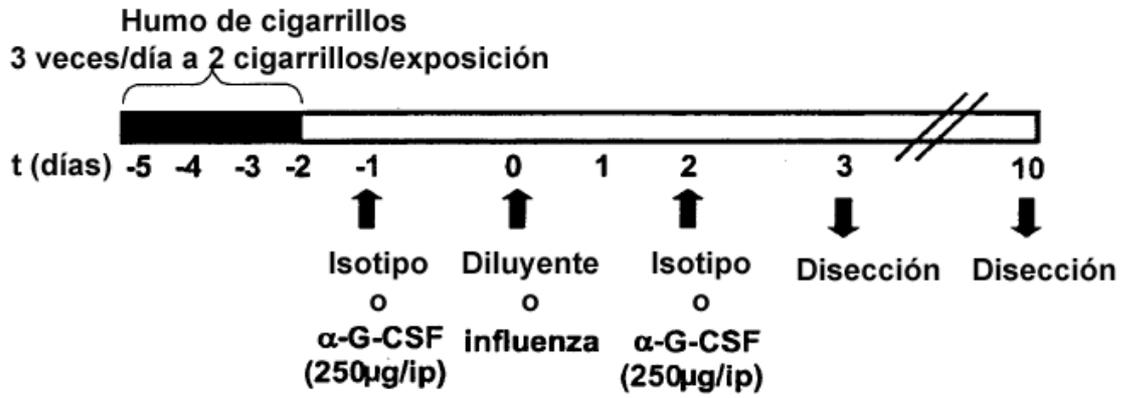


Figura 11

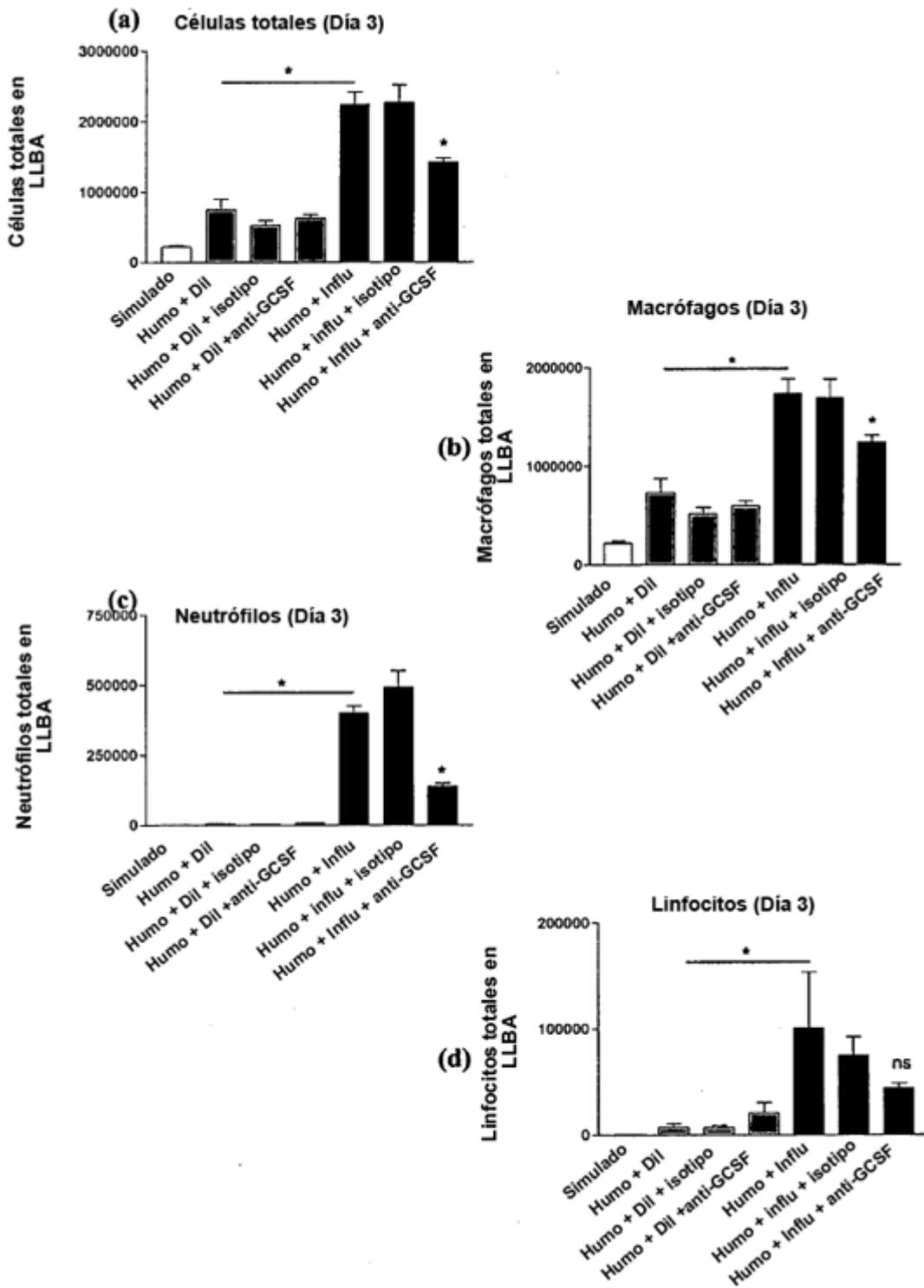


Figura 12

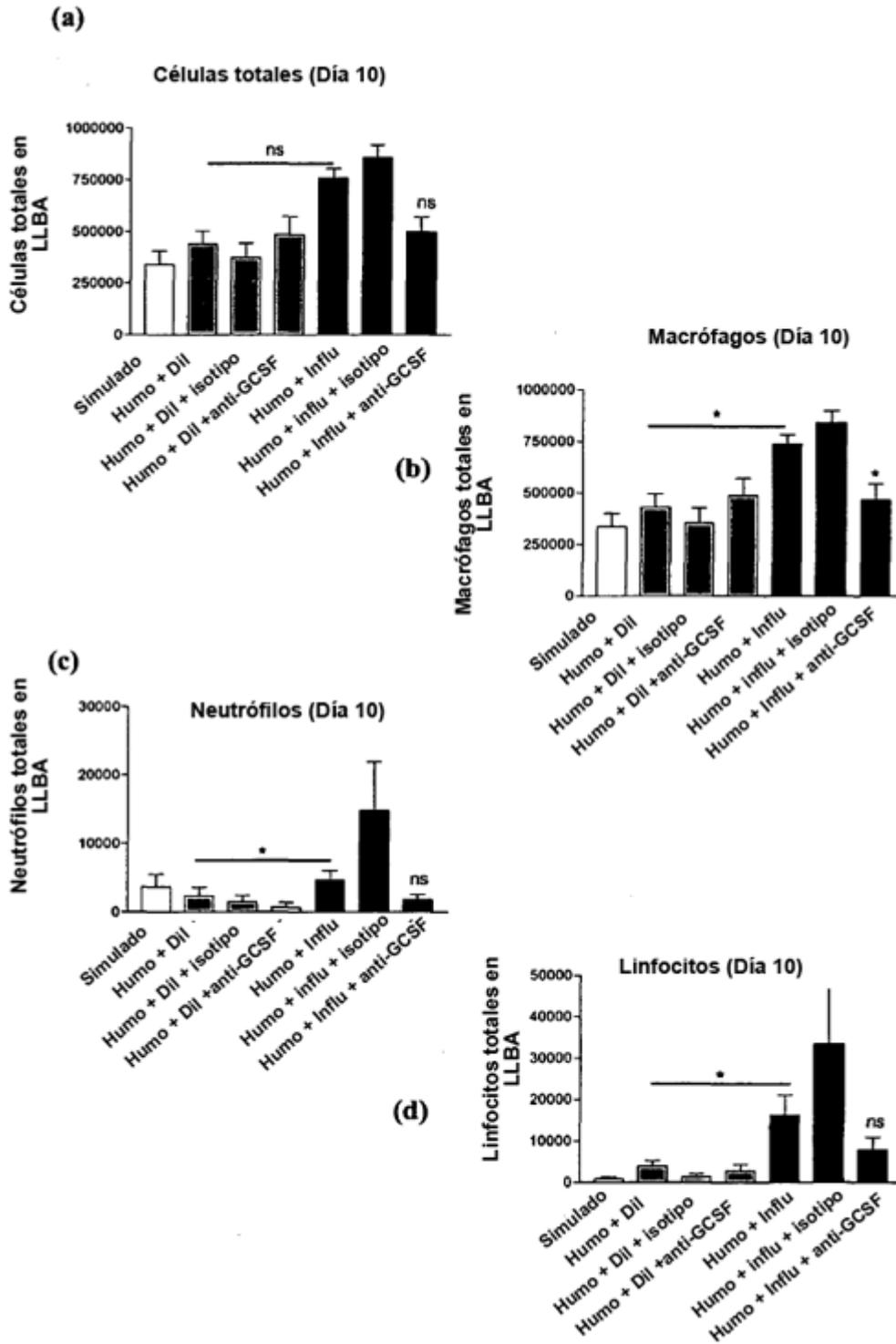
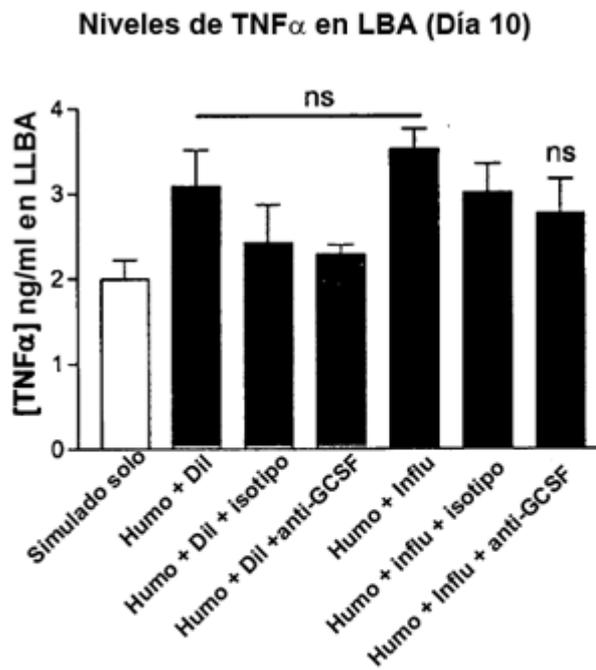
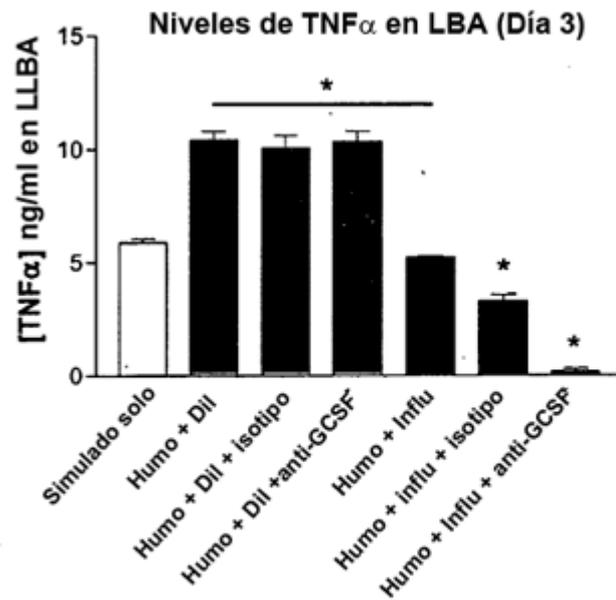


Figura 13



**Figura 14**

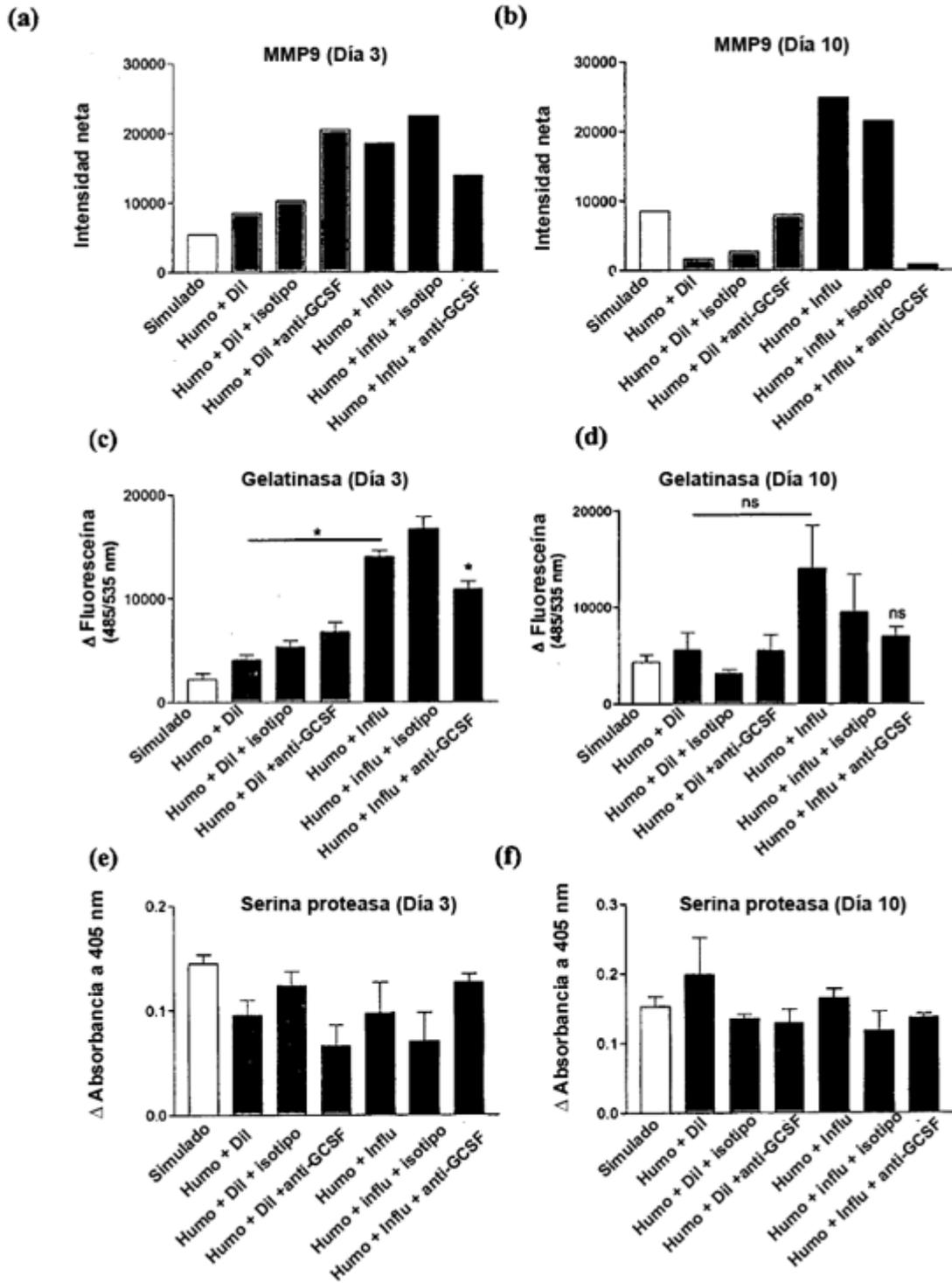
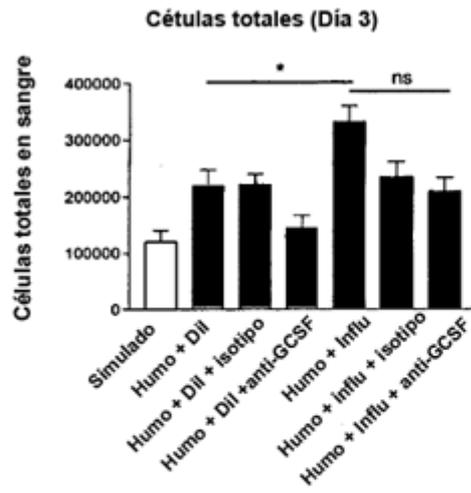
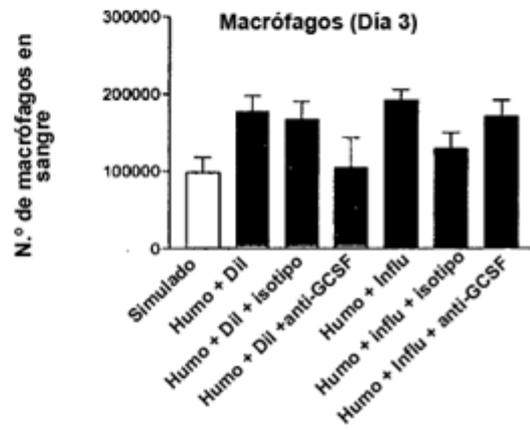


Figura 15

(a)



(b)



(c)

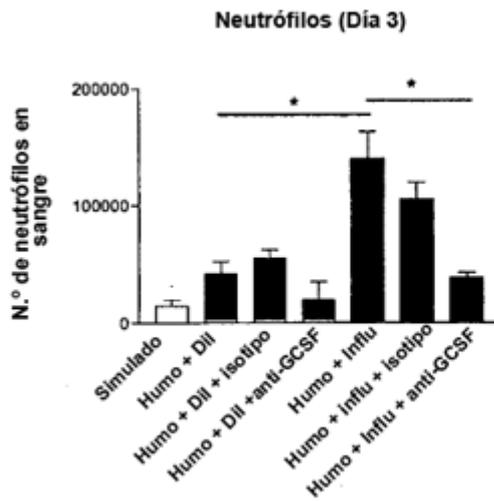


Figura 16

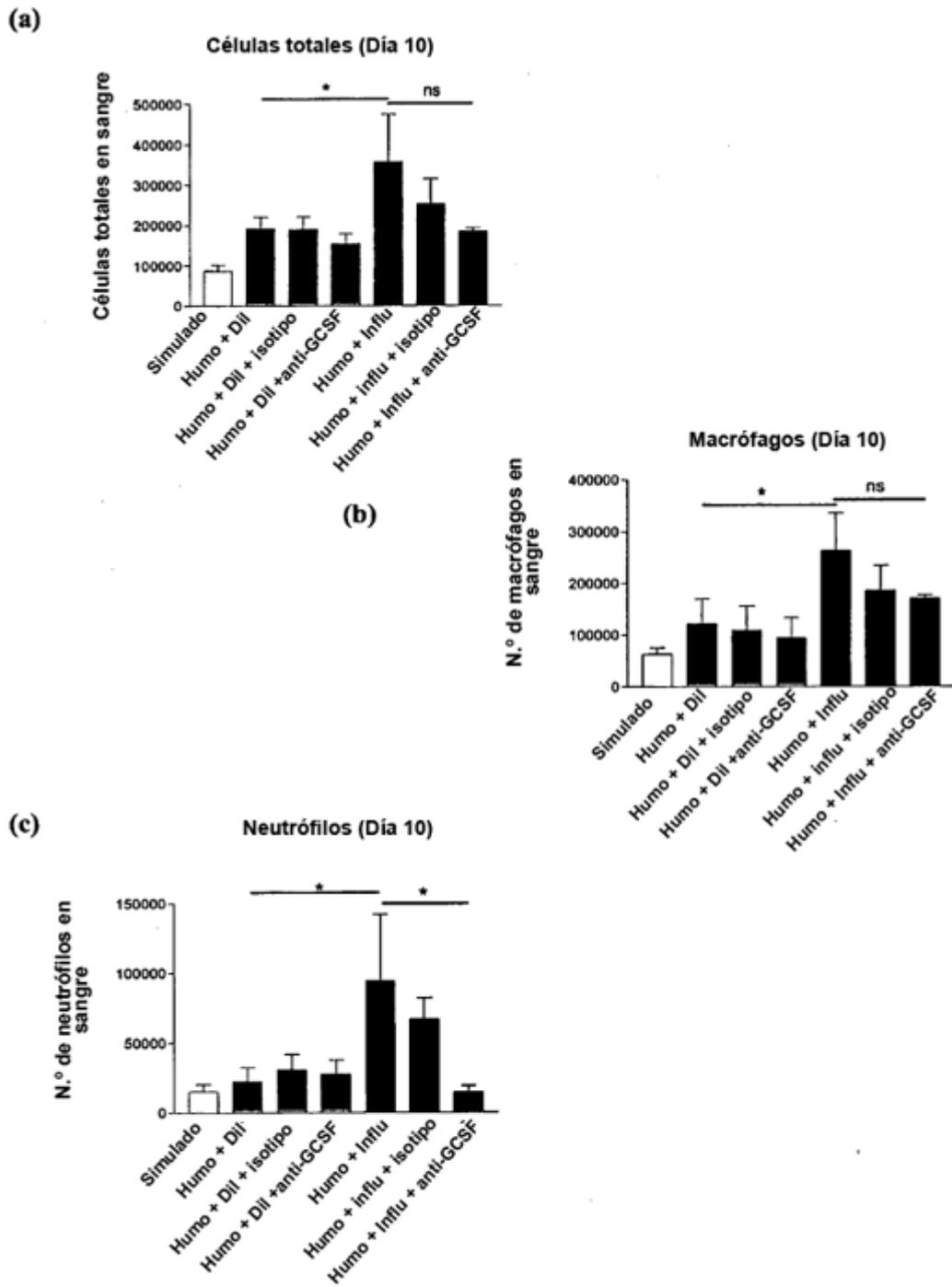
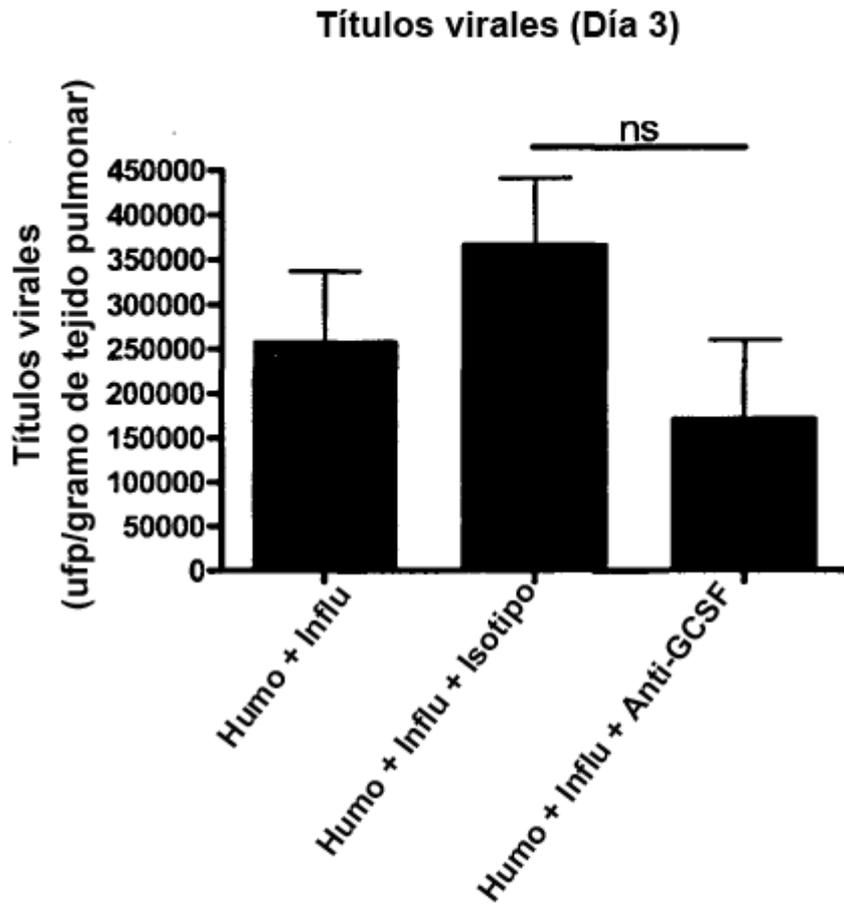


Figura 17



**Figura 18**

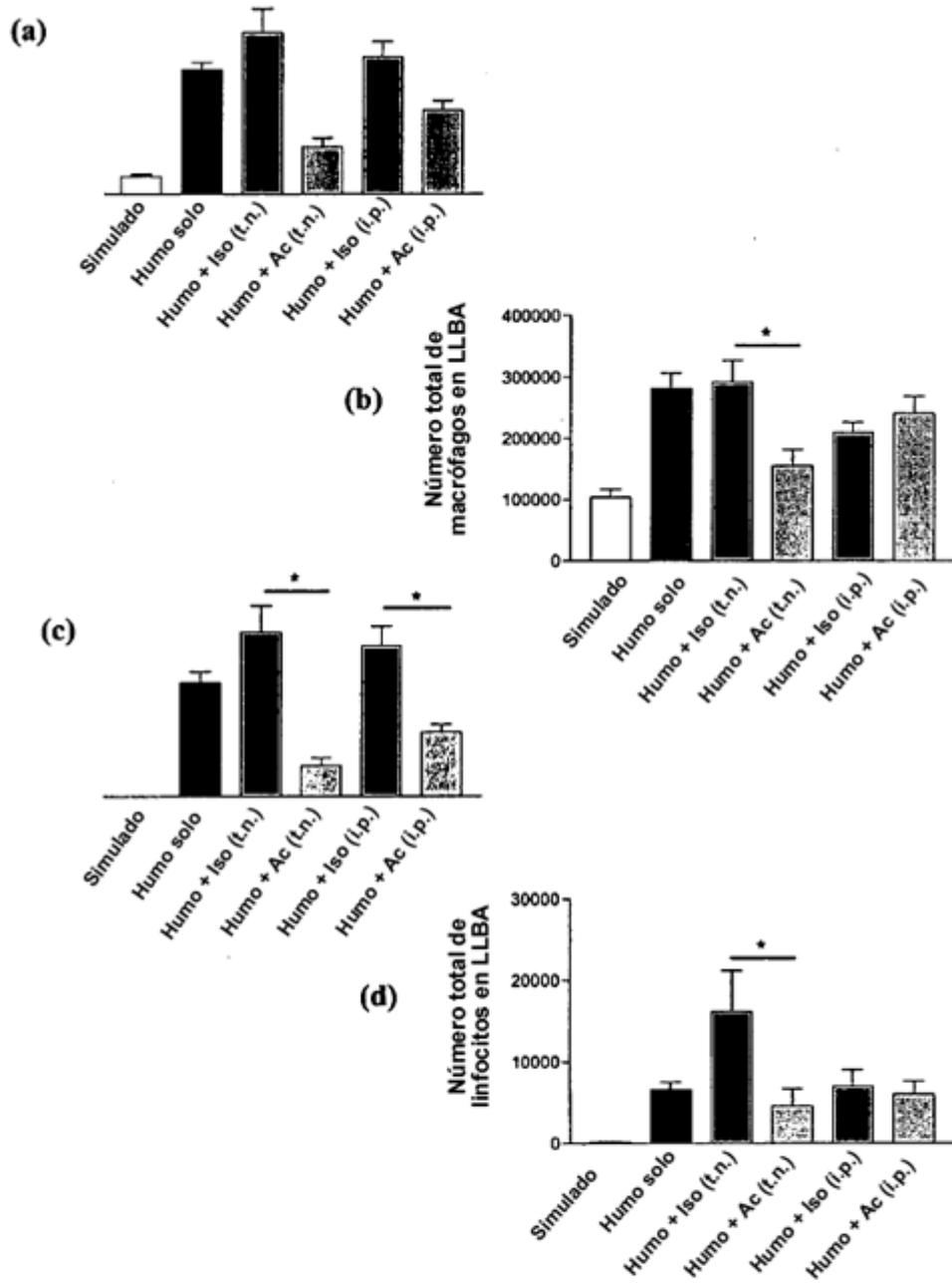


Figura 19