

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 298**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2009 E 09719048 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2262836**

54 Título: **Anticuerpo contra el CSF-1R**

30 Prioridad:

14.03.2008 EP 08360005

10.04.2008 US 43884 P

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

21.04.2016

73 Titular/es:

**TRANSGENE SA (100.0%)
Boulevard Gonthier d'Andernach, Parc
d'Innovation
67400 Illkirch Graffenstaden, FR**

72 Inventor/es:

**HAEGEL, HÉLÈNE;
THIOUDELLET, CHRISTINE;
GEIST, MICHEL y
GRELLIER, BENOÎT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 298 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

Anticuerpo contra el CSF-1R

El CSF-1 (Factor-1 Estimulante de Colonias) es una citocina expresada particularmente por diversos tipos de células. Es un factor de diferenciación, crecimiento y supervivencia para las células del linaje fagocítico mononuclear, que expresa el receptor para CSF-1 (CSF-1R) (SHERR. Colony-stimulating factor-1 receptor. blood. 1990, vol.75, no.1, p.1-12). El CSF-1 R es un receptor de tirosina quinasa codificado por el protooncogén *c-fms* que contiene un dominio de quinasa intracelular y una región extracelular de unión a ligando organizada en cinco subdominios de tipo inmunoglobulina. La respuesta a CSF-1 da como resultado una supervivencia, un crecimiento, una diferenciación y cambios reversibles en función aumentados. El propio gen *c-fms* es un marcador de diferenciación de macrófagos. El grado de expresión de *c-fms* es más fuerte que el de otros genes específicos de macrófagos incluyendo el de la lisozima y el de una proteína tirosina fosfatasa específica de macrófagos. (HUME, y col. Regulation of CSF-1 receptor expresión. Molecular reproduction and development. 1997, vol.46, no.1, p. 46 a 52).

Además de en las células del linaje fagocítico mononuclear, el CSF-1R también se expresa en muchos tipos de tumores humanos. En el cáncer de mama, la expresión del CSF-1R está asociada con tamaños de tumor más grandes y con una supervivencia disminuida (KLUGER, y col. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. Clinical cancer research. 2004, vol.10, no.1, p.173-7; SCHOLL, y col. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. Journal of the National Cancer Institute. 1994, vol.86, no.2, p.120-6). En cáncer de ovario epitelial, la mayoría de los tumores primarios y las metástasis, expresan fuertemente el CSF-1R, y la metástasis frecuentemente coexpresa CSF-1 y CSF-1R. El CSF-1R también se expresa en macrófagos de infiltración de tumor (CHAMBERS y col. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. Clinical Cancer Research. 1997, vol.3, no. 6, p. 999-1007). En cánceres de ovario y endometriales, el análisis de transferencia Northern muestra que la gran mayoría de los tumores expresan conjuntamente CSF-1 y CSF-1R, en tanto que la expresión de CSF-1R se detecta únicamente en forma débil en muestras de tejido endometrial normal (BAÏOCCHI, y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. Cancer. 1991, vol.67, no.4, p. 990-6). En carcinomas de cuello uterino, la expresión de CSF-1R está regulada positivamente tanto en estroma de tumor como en epitelio de tumor, en comparación con endometrio normal (KIRMA, y col. Elevated expression of the oncogene *c-fms* and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing *c-fms* expression. Cancer res. 2007, vol.67, no.5, p. 1918-26). En carcinoma renal, la infiltración de macrófagos asociados con tumor que expresan altos niveles de CSF-1R está asociada con la progresión del tumor (HEMMERLEIN, y col., Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, *c-fms*, CSF-1, and human monocyte serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. Cancer immunology, immunotherapy. 2000, vol.49, no.9, p. 485-92). El CSF-1R se expresa en casi el 100% de muestras de neoplasia o cáncer intraepitelial prostático (IDE, y col. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002, vol.99, no.22, p. 14404-9). La expresión de CSF-1R también se ha detectado en leucemias mieloblásticas agudas y en leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B (RAMBALDI, y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and *c-fms* genes in human acute myeloblastic leukemia cells. Journal of Clinical Investigation. 1988, vol.81, no.4, p. 1030-5).

Los trabajos realizados con inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, han demostrado especificidad de la expresión del CSF-1 en células de cáncer de mama invasivo, mientras que dicha producción no se observa en células tumorales intracanal o no invasivas (SCHOLL y col. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. Journal of the National Cancer Institute. 1994, Vol.86, no.2, p. 120-6; TANG y col. M-CSF (Monocyte Colony Stimulating Factor) and M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes? Journal of cellular biochemistry. 1992, vol.50, no.4, p. 350-6). La producción de CSF-1 por células tumorales invasivas se correlaciona con su aumento en la concentración en el plasma de pacientes, en donde puede superar 1000 pg/ml en comparación con menos de 300 pg/ml en sujetos normales. La alta concentración en suero se correlaciona con etapas avanzadas de la enfermedad y con pronósticos desfavorables a corto plazo (SCHOLL y col. Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. British journal of cancer. 1994, vol.69, no.2, p. 342-6; SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. Breast cancer research and treatment 1996, vol.39, no.3, p. 275-83.). Además, se ha demostrado que el CSF-1 estimula la movilidad e invasividad de las células tumorales (DORSCH y col. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. European journal of immunology. 1993, vol.23, no.1, p.186-90; WANG y col. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. Journal of immunology. 1988, vol.141, no.2, p.575-9; FILDERMAN y col. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. Cancer res. 1992, vol.52, no.13, p.3661-6).

El CSF-1 también tiene un efecto quimiotáctico en precursores de la línea mieloidea, lo que facilita la infiltración de monocitos en el tumor. Sin embargo, la presencia de estos monocitos no es suficiente para observar la destrucción del tumor por el sistema inmunitario. (DORSCH y col. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90). Parece que el alto contenido en suero, normalmente hallado en pacientes que padecen tumores de mama, de ovario o de páncreas, conduce al CSF-1 a la diferenciación de estos monocitos en macrófagos y no a células dendríticas con la capacidad de presentar antígenos tumorales y de esta forma iniciar una respuesta inmunitaria citotóxica eficaz dirigida contra las células tumorales (SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83; BARON y col. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *Journal of cell science*. 2001, vol.114 no.pt5, p.999-1010).

El CSF-1 es también esencial para la proliferación y diferenciación de osteoclastos. (CECCHINI y col. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol.46, no.1, p.75-83). Los osteoclastos son células multinucleadas que expresan el CSF-1R, que proceden de precursores hematopoyéticos que son los principales responsables de la degradación de hueso mineralizado durante el desarrollo, la homeostasis y la reparación de huesos. En diversos trastornos esqueléticos, tales como osteoporosis, hipercalcemia neoplásica, artritis reumatoide, metástasis tumoral y enfermedad de Paget, la reabsorción ósea por los osteoclastos supera la formación ósea por osteoclastos lo que conduce a la disminución de la masa ósea, a la fragilidad esquelética y a la fractura de huesos. (BRUZZANITI y col. Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine*. 2006, vol.7, no.1-2, p.123-39). Por ejemplo, los pacientes con cáncer de mama avanzado frecuentemente desarrollan metástasis ósea. La metástasis ósea produce dolor intratable y un alto riesgo de fracturas debido a una pérdida ósea conducida por el tumor (osteolisis), lo que se produce por un aumento de la actividad osteoclástica (CICEK y col. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer metastasis reviews*. 2006, vol.25, no.4, p.635-44). Se ha mostrado que la osteolisis está relacionada con un alto nivel de CSF-1 en la circulación (KITAURA y col. The journal of clinical investigation. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. 2005, vol.115, no.12, p.3418-27).

La ruta del CSF-1 también está implicada en la mediación de la inflamación intestinal en enfermedades tales como enfermedad inflamatoria intestinal (MARSHALL y col. Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-1) leads to inhibition of DSS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2007, vol.13, no.2, p.219-24), en la mediación de la proliferación de macrófagos durante rechazo agudo de aloinjerto (JOSE, y col. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *American journal of transplantation*. 2003, vol.3, no.3, p. 294-300) y en la replicación del HIV-1 en macrófagos infectados (KUTZA y col. Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages. *Journal of immunology*. 2000, no.164, p. 4955-4960).

Por estas razones, para el tratamiento del cáncer y de la degradación de huesos se ha propuesto la inhibición de la actividad del CSF-1 con diversos compuestos.

Antecedentes de la Invención

El documento WO 01/30381 se refiere al uso de inhibidores de la actividad del CSF-1 en la producción de medicamentos para el tratamiento de enfermedades tumorales. Las dos estrategias propuestas para la inhibición de la actividad del CSF-1 son la supresión de la propia actividad del CSF-1 y la supresión de la actividad del CSF-1R. Los anticuerpos neutralizantes contra el CSF-1 o contra su receptor son los preferidos como inhibidores de la actividad del CSF-1.

El documento WO 03/059395, describe productos de combinación que comprenden una sustancia con la capacidad de inhibir la actividad del CSF-1 y una sustancia que tiene actividad citotóxica para el tratamiento de cáncer.

El documento WO 2005/068503, desvela un procedimiento para prevenir y tratar la osteolisis, la metástasis de cáncer y la pérdida ósea asociada con metástasis de cáncer, administrando a un sujeto un anticuerpo contra CSF-1.

El documento EP 1488792 se refiere al uso de compuestos de aril o heteroaril quinazolina mono y/o bicíclicos que exhiben inhibición selectiva de diferenciación, proliferación o liberación mediadora, inhibiendo de manera eficaz la actividad de tirosina quinasa del CSF-1R. La presente solicitud también se refiere al uso de dichos compuestos para la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación celular anómala.

Sherr y col., *Blood*, vol.73, No 7; 1989, págs. 1786-1793 desvelan cuatro anticuerpos inhibidores anti-CSF-1 R que bloquean la unión de CSF-1 a concentraciones nanomolares.

El documento US 2005059113 se refiere a anticuerpos y a partes de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente al CSF-1. La presente invención también se refiere a anticuerpos anti-CSF-1 humanos y a partes de unión a antígeno de los mismos. Esta solicitud de invención también proporciona procedimientos de terapia genética utilizando moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina pesada y/o ligera que comprenden los anticuerpos anti-CSF-1 humanos.

Descripción de la Invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al CSF-1R.

Tal como se utiliza a lo largo de la solicitud, los términos “un”, “uno” y “una” se utilizan en el sentido de que significan “al menos uno(a)”, “al menos un(a) primer(a)”, “uno(a) o más”, o “una pluralidad” de los componentes o de las etapas a los que se hace referencia, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo sus mezclas.

El término “y/o” siempre que se utiliza en el presente documento, incluye el significado de “y”, “o” y “todos o cualquiera de una combinación de los elementos conectados por dicho término”.

El término “alrededor de” o “aproximadamente”, tal como se utiliza en el presente documento, significa dentro del 20%, preferentemente dentro del 10% y más preferentemente dentro del 5% de un valor o intervalo determinado.

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones “que comprende” y “comprende” pretenden significar que los kits de partes, productos, composiciones y procedimientos incluyen los componentes o etapas a los que se hace referencia, pero sin excluir otros. Cuando la expresión “que consiste esencialmente en” se utiliza para definir productos, composiciones y procedimientos, debe significar que se excluyen otros componentes o etapas de cualquier significado esencial. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los componentes mencionados no excluiría contaminantes residuales y transportadores farmacéuticamente aceptables. La expresión “que consiste en” debe significar que se excluyen más elementos residuales de otros componentes o etapas.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “se une específicamente a” se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de una proteína diana en presencia de una población heterogénea de proteínas y de otros compuestos biológicos. Por lo tanto, en las condiciones de ensayo indicadas, el anticuerpo de acuerdo con la invención, se une preferentemente a al menos la parte del CSF-1R y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de ensayo. La unión específica entre el anticuerpo de acuerdo con la invención y el CSF-1R diana significa que la afinidad de unión es de al menos 10^3 M^{-1} , y preferentemente de 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} .

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “CSF-1R” se refiere al receptor del CSF1 humano. El receptor del CSF-1 humano se ha secuenciado y su secuencia de aminoácido se ilustra en la SEQ ID NO: 29.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” o “Ab, por *antibody*” se utiliza en el sentido más amplio. Por lo tanto, un “anticuerpo” o “Ab” puede ser de origen natural o sintético, tal como los anticuerpos monoclonales (mAb, por *monoclonal antibodies*) producidos mediante tecnología de hibridoma convencional, tecnología recombinante y/o un fragmento funcional de los mismos. Los anticuerpos de la presente invención pretenden incluir moléculas de inmunoglobulina intacta, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (mAb), un anticuerpo mono-específico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo de ser humano, un anticuerpo de un animal (por ejemplo, un anticuerpo de camélido), anticuerpos quiméricos, así como partes, fragmentos, regiones, péptidos y derivados de los mismos (proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como, pero sin limitación, técnicas de escisión enzimática, de síntesis peptídica o recombinantes), tales como, por ejemplo, inmunoglobulina desprovista de cadenas ligeras (véase, por ejemplo, el documento US 6.005.079), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, fragmento de anticuerpo, diacuerpo, Fd, regiones CDR, o cualquier parte o secuencia peptídica del anticuerpo que tenga la capacidad de unirse a un antígeno o a un epítipo. Se dice que un anticuerpo tendrá “la capacidad de unirse a” una molécula, si tiene la capacidad de reaccionar específicamente con la molécula para unir de esta forma la molécula con el anticuerpo. Los fragmentos o partes de un anticuerpo, pueden carecer del fragmento Fc del anticuerpo intacto, eliminarse más rápidamente de la circulación, y pueden tener menor unión tisular no específica que un anticuerpo intacto. Los ejemplos de anticuerpo pueden producirse de anticuerpos intactos utilizando procedimientos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Véase, por ejemplo, Wahl y col., 24 J. Nucl. Med. 316-25 (1983). Las partes de anticuerpos pueden elaborarse mediante cualquiera de los procedimientos anteriores, o pueden elaborarse expresando una parte de la molécula recombinante. Por ejemplo, la región(s) CDR de un anticuerpo recombinante puede aislarse y subclonarse en el vector de expresión adecuado.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “región variable” se refiere a la región variable, o dominio, de la cadena ligera (VL) o de la cadena pesada (VH) que contiene los determinantes para unirse a la especificidad de reconocimiento. Los dominios variables están implicados en el reconocimiento antigénico y forman el sitio de unión antigénico. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “región marco conservada, *framework*” se refiere a partes de las regiones variables de cadena ligera y pesada que son al menos 85% homólogas (es decir, distintas de las CDR) entre diferentes anticuerpos en la misma especie. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “homólogo” se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que, cuando se alinean utilizando el algoritmo de Smith y Waterman (SMITH y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, no.147, p.195-7), tienen aproximadamente el porcentaje designado de los mismos aminoácidos. Por ejemplo, “homólogo al 85%” se refiere a una comparación de los

aminoácidos de dos polipéptidos que, cuando se alinean óptimamente tienen una identidad de aminoácidos del 85%. La región variable de la cadena tanto pesada como ligera, se divide en segmentos que comprenden cuatro subregiones marco conservadas (FR1, FR2, FR3, y FR4), interrumpidas por tres tramos de secuencias hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad (CDR), tal como se define en la base de datos de Kabat (Kabat y col. citado anteriormente), colocándose la CDR1 entre la FR1 y la FR2, colocándose la CDR2 entre la FR2 y la FR3 y colocándose la CDR3 entre la FR3 y la FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco conservada, tal como la denominan otros autores, representa las FR combinadas dentro de la región variable de cadena de inmunoglobulina sencilla de origen natural. Tal como se utiliza en el presente documento, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco conservada. Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. Una región marco conservada de un anticuerpo es la región marco conservada combinada de las cadenas ligera y pesada constituyentes y sirve para colocar y alinear las CDR. Las CDR son las responsables principales de formar el sitio de unión de un anticuerpo que confiere especificidad de unión y afinidad a un epítipo de un antígeno. Dentro de las regiones variables de las cadenas H o L que determinan las regiones de unión al antígeno, hay secuencias más pequeñas denominadas “hipervariables” debido a su extrema variabilidad entre anticuerpos de diferente especificidad. Dichas regiones hipervariables también reciben el nombre de “regiones determinantes de la complementariedad” o “regiones”. Estas regiones CDR son las responsables de la especificidad básica del anticuerpo por una estructura determinante antigénica particular. Las CDR representan tramos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables aunque, con independencia de la especie, se ha descubierto que las ubicaciones de las posiciones de estas secuencias de aminoácidos críticas dentro de las regiones variables de cadena pesada y ligera, tienen ubicaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Cada una de las cadenas variables pesada y ligera de todos los anticuerpos tiene 3 regiones CDR, cada una de ellas no contigua entre sí (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las cadenas ligeras (L, *light*) y pesadas (H, *heavy*) respectivas. Kabat y col., 252 J. Biol. Chem. 6609-16 (1977) describieron las regiones CDR aceptadas y los bucles de las CDR pueden identificarse aplicando estas reglas durante una revisión de una secuencia de aminoácidos lineal. Las reglas para definir el bucle H3 de la CDR pueden variar, sin embargo (véase el capítulo 4, Construcción de Anticuerpos: Procedimientos y Protocolos, (Lo, ed. Humana Press, Totowa, NJ, 2004)), y los límites reales de algunos bucles H3 de la CDR puede que no se identifiquen en técnicas experimentales tales como difracción circular, resonancia magnética nuclear, o cristalografía de rayos X. En todas las especies de mamíferos, los péptidos de anticuerpo contienen regiones constantes (es decir, altamente conservadas) y variables, y, en estas últimas, se encuentran las CDR y las denominadas “regiones marco conservadas” constituidos por secuencias de aminoácidos dentro de la región variable de la cadena pesada o ligera aunque fuera de las CDR. Las regiones CDR también pueden definirse utilizando nomenclatura de Chothia (CHOTHIA y LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) J Mol Biol. 20 de agosto 1987; 196(4):901-17). Por consiguiente, en determinadas realizaciones, las CDR son las CDR definidas por Kabat y en otras realizaciones son las CDR definidas por Chothia. Con respecto a la determinación antigénica reconocida por las regiones CDR del anticuerpo, esta también recibe el nombre de “epítipo”. En otras palabras, el epítipo se refiere a la parte de cualquier molécula con la capacidad de ser reconocida por un anticuerpo y de unirse al mismo (la región de unión del anticuerpo correspondiente puede denominarse parátipo). En general, los epítipos consisten en agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activas, por ejemplo, aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específica.

La expresión “anticuerpo monoclonal” o “mAb” tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que procede de un solo clon. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando técnicas de hibridoma, tales como las descritas en HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2ª edición. Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988 y HAMMERLING, y col., Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas. Nueva York: Elsevier, 1981. p. 563-681.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables y constantes procedentes de, o con un alto grado de coincidencia con, secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. El anticuerpo humano de la invención puede incluir restos de aminoácidos no codificados por la secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis específica del sitio o aleatoria *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo en el cual, sustancialmente cada parte de la proteína, es sustancialmente similar a un anticuerpo de línea germinal humana. La expresión “sustancialmente similar” se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos 80, preferentemente 85, más preferentemente 90 e incluso más preferentemente 95% con la secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo de línea germinal humana.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “Fab” se refiere a regiones de moléculas de anticuerpo que incluyen la región variable de la cadena pesada y cadena ligera y que exhiben actividad de unión. El término “Fab” incluye agregados de una cadena pesada y una ligera (comúnmente conocida como Fab), si cualquiera de las anteriores se agregan de forma covalente o no covalente, siempre que la agregación tenga la capacidad de reaccionar selectivamente con un antígeno o familia de antígeno en particular. El fragmento Fab es un heterodímero que comprende un VL y un segundo polipéptido que comprende los dominios VH y CH1. En una realización

preferida el anticuerpo es un fragmento Fab'. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab, ya que el fragmento Fab' contiene algunos restos en el término carboxilo del dominio de cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la "región bisagra" del anticuerpo.

5 El fragmento "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo obtenido por el tratamiento con pepsina de un anticuerpo o a la proteína equivalente obtenida a través de otras técnicas tales como tecnologías recombinantes. El fragmento F(ab')₂ tiene dos sitios de combinación antigénica y aún tiene la capacidad de entrecruzarse con un antígeno.

10 El fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión y de reconocimiento antigénico completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera, en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión antigénica en la superficie del dímero VH VL. En su conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión antigénica para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad si se compara con el sitio de unión completo.

15 El "Fv monocatenario" o "scFv, *single chain Fv*" comprende los dominios VH y VL del anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión antigénica (LENNARD. Standard protocols for the construction of scFv libraries. Methods in molecular biology. 2002, no.178, p. 59-71).

20 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse específicamente al CSF-1R.

25 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión antigénica, en la que los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH VL). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión antigénica. Los diacuerpos pueden unirse a uno o a más epítopos. Los diacuerpos se describen de forma más completa en POLJAK. Production and structure of diabodies. Structure. 1994, vol.2, no.12, p.1121-3, HUDSON y col. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. Journal of immunological methods. 1999, vol.231, no.1-2, p.177-89 y en KIPRIYANOV. Generation of bispecific and tandem diabodies. Methods in molecular biology. 2002, no.178, p.317-31.

30 Para la producción de fragmentos de anticuerpo se han desarrollado varias técnicas. Tradicionalmente estos fragmentos se obtuvieron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente en células hospedadoras recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse en *E. coli*, permitiendo de esta forma la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. A los expertos en la materia las técnicas de producción de fragmentos de anticuerpo les resultarán obvias. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv).

35 Tal como se utiliza en el presente documento los "anticuerpos de dominio" (dAbs, *domain antibodies*) consisten en las unidades de unión funcional más pequeñas de los anticuerpos, que corresponden a las regiones variables bien de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o inferior a una décima parte del tamaño de un anticuerpo completo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Fd" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios VH y CH1.

45 El término "anticuerpo" o "Ab" también se refiere a otro fragmento de anticuerpo bien conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo, los descritos en HOLLIGER y col. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature biotechnology. 2005, vol.23, no.9, p.1126-36 y en HOOGENBOOM y col. Natural and designer binding sites made by phage display technology. Immunology today. 2000, vol.21, no.8, p.371-8.

50 De acuerdo con una realización, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable que comprende las tres CDR expuestas en las SEQ ID NO: 11, 12 y 13 y una región variable que comprende las tres CDR expuestas en las SEQ ID NO: 14, 15 y 16.

En realizaciones preferidas, la región variable comprende adicionalmente una, más preferentemente dos, incluso más preferentemente tres y de manera definitiva preferentemente cuatro regiones marco conservadas, y más preferentemente la FR humana.

55 De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende una región variable, en la que la región variable comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6.

En otra realización preferida, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende una región variable, en la que la región variable comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 9.

El anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende:

- 5 (i) una región variable que comprende las tres CDR como se expone en las SEQ ID NO: 11, 12, y 13, y
(ii) una región variable que comprende las tres CDR como se expone en las SEQ ID NO: 14, 15, y 16.

De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende:

- 10 (i) una región variable como se expone en la SEQ ID NO: 6 y
(ii) una región variable como se expone en la SEQ ID NO: 9.

De acuerdo otra realización, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las tres CDR como se expone en las SEQ ID NO: 11, 12, y 13, y (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las tres CDR como se expone en las SEQ ID NO: 14, 15 y 16.

- 15 El anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende (i) una región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y (ii) una región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9.

De acuerdo con otra realización preferida, el anticuerpo se une específicamente a CSF-1R y es un scFv, en el que dicho scFv comprende:

- 20 (i) una región variable que comprende las tres CDR como se expone en las SEQ ID NO: 11, 12, y 13, y
(ii) una región variable que comprende las tres CDR como se expone en las SEQ ID NO: 14, 15, y 16.

De acuerdo con una realización más preferida, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y es un scFv, en el que dicho scFv comprende:

- 25 (i) una región variable como se expone en la SEQ ID NO: 6 y
(ii) una región variable como se expone en la SEQ ID NO: 9.

En una realización incluso más preferida, se proporciona el scFv en el que al menos un aminoácido está sustituido (de acuerdo con la Tabla 1 y la Tabla 2) dentro de la secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO 6 y 9. En una realización definitivamente preferida se proporciona el anticuerpo humano en el que todos los aminoácidos representados en la Tabla 1 y Tabla 2 están sustituidos (de acuerdo con la Tabla 1 y Tabla 2) dentro de la secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO 6 y 9.

- 30 De acuerdo con una realización más preferida, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende la cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 2 y la cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con una realización incluso más preferida, el anticuerpo de la invención se une específicamente a CSF-1R y comprende dos cadenas pesadas como se expone en la SEQ ID NO: 2 y dos cadenas ligeras como se expone en la SEQ ID NO: 4. Este anticuerpo particular se denominará CXIG6 a lo largo de la presente solicitud.

- 35 En una realización más preferida, se proporciona el anticuerpo humanizado en el que al menos un aminoácido está sustituido (de acuerdo con la tabla 1 y tabla 2) dentro de la secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO: 6 y 9. En una realización incluso más preferida, se proporciona el anticuerpo humano en el que todos los aminoácidos representados en la tabla 1 y tabla 2 (de acuerdo con la tabla 1 y tabla 2) están sustituidos dentro de la secuencia de aminoácidos como se expone en las SEQ ID NO: 6 y 9.

Tabla 1

SEQ ID NO: 6	Posición	Sustitución preferida
K	3	Q
E	5	V
M	18	L
K	19	R
W	33	Y
S	40	A

ES 2 567 298 T3

(continuación)

SEQ ID NO: 6	Posición	Sustitución preferida
E	42	G
M	43	K
A	49	G
E	50	R
I	51	T
A	59	T
F	61	E
E	64	A
S	79	N
V	81	L
R	89	K
P	90	T,A
G	94	A
I	95	V
T	99	A
N	107	Y,V
T	113	L
L	114	V

Tabla 2

SEQ ID NO:6	Posición	Sustitución preferida
A	9	S
V	13	A
E	17	D
T	18	R
E	27	Q
N	28	G
Q	40	P,D
S	43	A
Q	45	K
V	48	L
H	49	Y
N	53	R
A	55	E
D	56	S
Q	70	D
Y	71	F
S	72	T
K	74	T
N	76	S

(continuación)

SEQ ID NO:6	Posición	Sustitución preferida
S	80	P
G	84	A
S	85	T
H	90	Q
G	100	Q

5 El anticuerpo, más específicamente el anticuerpo humanizado, de acuerdo con la invención puede ser de diferentes isotipos, tales como IgG, IgA, IgM o IgE. En una realización preferida, el anticuerpo, más específicamente el anticuerpo humanizado, de acuerdo con la invención es una IgG.

En una realización relacionada, el anticuerpo humano comprende una región constante modificada o no modificada de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En una realización preferida, la región constante es IgG1 o IgG4 humana, que opcionalmente puede modificarse para aumentar o disminuir determinadas propiedades.

10 En el caso de IgG1, las modificaciones en la región constante, particularmente en la región bisagra o región CH2, puede aumentar o disminuir la función efectora, incluyendo la actividad ADCC y/o CDC. En otras realizaciones, para disminuir la formación de agregados de antígeno-anticuerpo se modifica una región constante de IgG2. En el caso de IgG4, las modificaciones en la región constante, particularmente en la región bisagra, pueden reducir la formación de medios-anticuerpos.

15 La afinidad de unión deseada puede conservarse incluso aunque uno o más de los aminoácidos del anticuerpo estén mutados. Estas variantes tienen al menos un aminoácido en el anticuerpo reemplazado por un resto diferente. De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a CSF1-R como se describió anteriormente, en el que al menos uno de los aminoácidos incluidos en las CDR, se sustituye de manera conservativa. En la [tabla 3](#) se muestran sustituciones conservativas.

Tabla 3

Aminoácido original	Sustitución conservativa preferida	Sustitución conservativa más preferida
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, D, K, R	Q
P	E, N	E
C	S, A	S
Q	N, E	N
E	D, Q	D
G	A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	W, L, V, I, A, Y	Y
P	A	A
S	T	T
T	V, S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	L, M, F, A	L

La presente invención también se refiere a un proceso para modificar el anticuerpo de la invención mediante maduración por afinidad.

5 Tal como se utiliza en la presente invención, "maduración de afinidad" se refiere a la sustitución de uno o más aminoácidos incluidos en una o más CDR, dando la sustitución como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por CSF-1R, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dicha sustitución o sustituciones. Los procesos de maduración por afinidad son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los procedimientos descritos en MARKS y col. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. Biotechnology. 1992, vol.10, no.7, p.779-83; BARBAS y col. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994, vol.91, no.9, p.3809-13. SCHIER. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. Gene. 1996, vol.169, no.2, p.147-55. YELTON. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. J. immunol. 1995, vol.155, no.4, p.1994-2004; JACKSON y col. In vitro antibody maturation. Improvement of a high affinity, neutralizing antibody against IL-1 beta. J. immunol. 1995, vol.154, no.7, p.3310-9 y HAWKINS y col. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. Journal of molecular biology. 1992, vol.226, no.3, p.889-96.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo, que se une específicamente a CSF-1R, obtenido mediante maduración por afinidad tal como se describió anteriormente.

20 En otra realización, la presente divulgación proporciona variantes del anticuerpo descrito anteriormente, que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 80%, preferentemente de al menos 85%, más preferentemente de al menos 90% e incluso más preferentemente de al menos 98% con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo descrito anteriormente.

25 En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la divulgación se une específicamente a más de un epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede unirse a dos epítopos diferentes de CSF-1R. Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede tener la capacidad de unirse a CSF-1R y a otra molécula. Tal como se utiliza en la presente invención, los anticuerpos que se unen específicamente a más de un epítipo pueden ser anticuerpos entrecruzados. Por ejemplo, un anticuerpo puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos entrecruzados pueden elaborarse utilizando cualquiera de los procedimientos de entrecruzamiento convenientes conocidos en la técnica. También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo, véase, por ejemplo, BRENNAN y col. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. Science, 1985, vol. 229, no. 4708, p. 81-3 y SHALABY y col. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. The Journal of experimental medicine, 1992, vol. 175 (1), 217-25 KOSTELNY y col. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J. immunol., 1992, vol. 148, no 5, p. 1547-33.

35 El anticuerpo que se une específicamente a más de un epítipo es un diacuerpo.

De acuerdo con otra realización preferida, el anticuerpo que se une específicamente a más de un epítipo es un anticuerpo lineal tal como se describe en ZAPATA y col. Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in Escherichia coli and enhanced antiproliferative activity. Protein engineering, 1995, vol.8, no.10, p.1057-62.

40 El anticuerpo de acuerdo con la invención puede estar glucosilado o no glucosilado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucosilación" se refiere a la presencia de unidades de hidratos de carbono que están unidas de manera covalente al anticuerpo.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención, está conjugado con un agente radiosensibilizador, un receptor y/o un agente citotóxico.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "radiosensibilizador" se refiere a una molécula que hace a las células más sensibles a radioterapia. El radiosensibilizador incluye, pero no se limita a, metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxiaurea y cisplatino.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "receptor" se refiere a un compuesto con la capacidad de unirse específicamente a un ligando. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el receptor es biotina.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término agente citotóxico se refiere a un compuesto que es directamente tóxico para las células, impidiendo su reproducción o crecimiento. De acuerdo con una realización preferida, el agente citotóxico utilizado dentro del contexto de la presente invención se elige del grupo que comprende un agente terapéutico para cáncer, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de la misma) o un isotopo radioactivo.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención está conjugado a un agente marcador.

Tal como se utiliza en el presente documento, “un agente marcador” se refiere a un compuesto detectable. El agente marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la modificación química de un compuesto sustrato que sea detectable.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “conjugado” significa que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y el agente marcador se unen de manera covalente o no covalente.

El “enlace covalente” se refiere al acoplamiento a través de grupos funcionales reactivos, opcionalmente con el uso intermediario de un reticulante u otro agente activador (véase, por ejemplo, HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996). El anticuerpo de acuerdo con la presente invención y/o el agente conjugado pueden modificarse con el objeto de permitir su acoplamiento, por ejemplo, mediante sustitución en un grupo carbonilo activado (incluyendo los activados *in situ*) o un imidoéster, mediante la adición de un grupo carbonilo insaturado, mediante aminación reductora, sustitución nucleofílica en un átomo de carbono saturado o en un heteroátomo, mediante reacción en ciclos aromáticos. En particular, el acoplamiento se puede realizar utilizando reactivos reticulantes homobifuncionales o heterobifuncionales. Los reticulantes homobifuncionales que incluyen glutaraldehído, ácido succínico y bis-imidoéster de tipo DMS (suberimidato de dimetilo) se pueden utilizar para acoplar grupos amina que pueden estar presentes en las diversas porciones. En HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p. 118-228 se proporcionan numerosos ejemplos conocidos por los expertos en la técnica. Los reticulantes heterobifuncionales incluyen los que tienen grupos tanto reactivos de amina como reactivos de sulfhidrilo, grupos reactivos de carbonilo y reactivos de sulfhidrilo y grupos reactivos de sulfhidrilo y enlazadores fotorreactivos. Los reticulantes heterobifuncionales se describen, por ejemplo, en HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.229-285. Los ejemplos son, por ejemplo, SPDP (propionato de N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)), SMBP (butirato de succinimidil-4-(p-maleimidofenilo)), SMPT (tolueno de succinimidiloxicarbonil-metil(-2-piridilditio)), MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), SIAB (aminobenzoato de N-succinimidil(4-yodoacetilo)), GMBS (éster de γ -maleimidobutirilo)succinimida), SIAX (hexonato de amino succinimidil-6-yodoacetilo), SIAC (metil amino de succinimidil-4-yodoacetilo), NPJA (yodoacetato de p-nitrofenilo). Otros ejemplos son útiles para acoplar moléculas que contienen hidratos de carbono (por ejemplo, glucoproteínas de envoltura, anticuerpos) con grupos reactivos sulfhidrilo. Los ejemplos incluyen MPBH (hidrazida del ácido 4-(4-N maleimidofenil)butírico) y PDPH (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida (M2C2H e hidrazida de 3-2(2-piridilditio)propionilo).

- 30 De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención.

La expresión “secuencia de ácido nucleico” se refiere a una secuencia lineal de nucleótidos. Los nucleótidos son bien una secuencia lineal de polirribonucleótidos o polidesoxirribonucleótidos, o una mezcla de ambos. Los ejemplos de polinucleótidos en el contexto de la presente invención incluyen ADN mono- y bicatenario, ARN mono- y bicatenario y moléculas híbridas que tienen ambas mezclas de ARN y ADN mono- y bicatenario. Además, los polinucleótidos de la presente invención pueden tener uno o más nucleótidos modificados.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención está comprendida en un vector.

40 El vector puede ser de origen plasmídico o vírico y, cuando sea adecuado, puede combinarse con una o más sustancias que mejoran la eficiencia de la transfección y/o estabilidad del vector. Estas sustancias están muy documentadas en la bibliografía que está a disposición de los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, FELGNER y col., Cationic liposome mediated transfection. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 1989, vol.32, p.115-21. ; HODGSON, et al. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. Nature biotechnology. 1996, vol.14, no.3, p.339-42; REMY y col., Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. Bioconjugate chemistry. 1994, vol.5, no.6, p.647-54). A modo de ilustración no limitante, las sustancias pueden ser polímeros, lípidos, en particular lípidos catiónicos, liposomas, proteínas nucleares y lípidos neutros. Estas sustancias se pueden utilizar solas o en combinación. Una combinación que puede considerarse es la de un vector plasmídico recombinante que se combina con lípidos catiónicos (DOGS, DC-CHOL, espermina-col, espermidina-col, etc.), lisofosfolípidos (por ejemplo Hexadecilfosfololina) y lípidos neutros (DOPE).

- 50 De acuerdo con una realización preferida, los lípidos catiónicos que se pueden utilizar en la presente invención son los lípidos catiónicos que se describen en el documento EP 901463 B y más preferentemente pcTG90.

La elección de los plásmidos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención es amplia. Pueden ser vectores de clonación y/o vectores de expresión. De manera general, los expertos en la técnica los conocen, y aunque un gran número de ellos están disponibles en el comercio, también es posible construirlos o modificarlos utilizando técnicas de manipulación genética. Los ejemplos que se pueden mencionar son los plásmidos que proceden de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) o p Poly (LATHE y col., Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. Gene. 1987, vol.57, no.2-3, p.193-201). Preferentemente, un plásmido que se utiliza en el contexto de la presente invención contiene un origen

de replicación que garantiza que la replicación se inicia en una célula productora y/o en una célula huésped (por ejemplo, el origen de ColE1 será elegido para un plásmido con la intención de producirse en *E. coli* y el sistema oriP/EBNA1 será elegido si se desea que el plásmido se auto-replique en una célula huésped de mamífero, LUPTON y col. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and cellular biology*. 1985, vol.5, no.10, p.2533-42.; YATES y col. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 1985, vol.313, no. 6005, p. 812-5). El plásmido puede comprender adicionalmente un gen de selección que permite seleccionar o identificar las células transfectadas (un complemento de una mutación auxotrófica, un gen que codifica la resistencia a un antibiótico, etc). Naturalmente, el plásmido puede contener elementos adicionales que mejoran su mantenimiento y/o estabilidad en una célula determinada (la secuencia *cer*, que promueve el mantenimiento de un plásmido en forma monomérica (SUMMERS y col. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*. 1984, vol.36, no.4, p.1097-103, secuencias para la integración en el genoma celular).

Con respecto a un vector vírico, es posible considerar un vector que provenga de un poxvirus (virus de la variolovacuna, en particular MVA, poxvirus del canario, etc.), de un adenovirus, de un retrovirus, de un herpesvirus, de un alfavirus, de un espumavirus o de un virus asociado con adenovirus. Es posible utilizar vectores víricos competentes para la replicación o deficientes para la replicación. Se dará preferencia al uso de un vector que no se integre. A este respecto, los vectores adenovíricos y los vectores que proceden de poxvirus y, más preferentemente, del virus de la variolovacuna y del MVA, son particularmente muy adecuados para implementar la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida, el vector vírico de acuerdo con la invención procede de un Virus Variolovacunal Ankara Modificado (MVA). Los vectores del MVA y los procedimientos para producir dichos vectores se describen completamente en las patentes europeas EP 83286 A y EP 206920 A, así como en SUTTER y col. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, vol.89, no.22, p.10847-51). De acuerdo con una realización más preferida, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede insertarse en la deleción I, II, III, IV, V y VI del vector del MVA e incluso más preferentemente en la deleción III (MEYER y col. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. 1991, vol.72, no.Pt5, p. 1031-8; SUTTER y col. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. 1994, vol.12, no.11, p. 1032-40.)

Los retrovirus tienen la propiedad de infectar células que se están dividiendo, y en la mayoría de los casos, integrarse en las mismas y, a este respecto, son particularmente adecuados para su uso en relación con el cáncer. Un retrovirus recombinante de acuerdo con la presente, contiene generalmente secuencias de repetición terminal larga, LTR (del inglés *Long Terminal Repeat*), una región de encapsidación y la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención, que se coloca bajo el control de las LTR retrovíricas o de un promotor interno, tales como los que se describen más adelante. El retrovirus recombinante puede proceder de un retrovirus de cualquier origen (murino, primate, felino, humano, etc) y en particular del virus MoMuLV (virus de la leucemia murina de Moloney), del MVS (virus de sarcoma murino) o del retrovirus murino de Friend (Fb29). Este retrovirus se propaga en una línea celular de encapsidación que tiene la capacidad de suministrarse en *trans* en los polipéptidos víricos gag, pol y/o env, que se requieren para constituir una partícula vírica. Dichas líneas celulares se describen en la bibliografía (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc.). El vector retrovírico de acuerdo con la invención puede contener modificaciones, en particular en las LTR (reemplazo de la región promotora con un promotor eucariota) o en la región de encapsidación (reemplazo con una región de encapsidación heteróloga, por ejemplo, el tipo VL30) (véase el documento US 5747323).

Se dará preferencia también al uso de un vector adenovírico que carece de toda o de parte de al menos una región que es esencial para la replicación y que se selecciona de las regiones E1, E2, E4 y L1-L5 con el objeto de impedir que el vector se propague en el organismo huésped o en el entorno. Se prefiere una deleción de la región E1. Sin embargo, se puede combinar con (una) otra modificación(s)-deleción(s) que afecta, en particular, a toda o a parte de las regiones E2, E4 y/o L1-L5, hasta el grado de que las funciones esenciales defectuosas se complementan en *trans* mediante una línea celular de complementación y/o un virus auxiliar. A este respecto, es posible utilizar vectores de segunda generación del estado de la técnica (véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales. WO 94/28152 y WO 97/04119). A modo de ilustración, la deleción de la mayor parte de la región E1 y de la unidad de transcripción E4, es particularmente muy conveniente. Para el propósito de incrementar las capacidades de clonación, el vector adenovírico puede carecer adicionalmente de toda o de parte de la región no esencial E3. De acuerdo con otra alternativa, es posible utilizar un vector adenovírico mínimo que conserve las secuencias que son esenciales para la encapsidación, en concreto, las ITR (Repeticiones Terminales Invertidas) 5' y 3', y la región de encapsidación. Se conocen diversos vectores adenovíricos y técnicas para prepararlos (véase, por ejemplo, GRAHAM y col. *Methods in molecular biology*. Editado por MURREY. The human press inc, 1991. p. 109-128).

Además, el origen del vector adenovírico de acuerdo con la invención, puede variar tanto desde el punto de vista de la especie como desde el punto de vista del serotipo. El vector puede proceder del genoma de un adenovirus de origen humano o animal (canino, aviar, bovino, murino, ovino, porcino, simio, etc) o de un híbrido que comprenda fragmentos del genoma adenovírico de al menos dos diferentes orígenes. Se puede hacer una mención más

particular de los adenovirus CAV-1 o CAV-2 de origen canino, del adenovirus DAV de origen aviar o del adenovirus Bad de tipo 3 de origen bovino (ZAKHARCHUK y col. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA. Archives of virology. 1993, vol.128, no.1-2, p.171-6; SPIBEY y col. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2. The Journal of general virology. 1989, vol.70, no.Pt 1, p.165-72; JOUVENNE y col. Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes. Gene. 1987, vol.60, no.1, p. 21-8; MITTAL y col. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. The Journal of general virology. 1995, vol.76, no.Pt 1, p. 93-102). Sin embargo, se dará preferencia a un vector adenovirico de origen humano que proceda preferentemente de un adenovirus de serotipo C, en particular de un adenovirus de serotipo C de tipo 2 ó 5.

10 La expresión "competente para la replicación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere un vector vírico con capacidad de replicarse en una célula huésped en ausencia de cualquier complementación en trans.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el vector competente para la replicación es un vector adenovirico competente para la replicación. Estos vectores adenoviricos competentes para la replicación son muy conocidos por los expertos en la técnica. Entre estos, se prefieren particularmente los vectores adenoviricos delecionados en la región E1b que codifica el inhibidor P53 de 55kD, como en el virus ONYX-015 (BISCHOFF y col. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science. 1996, vol.274, no.5286, p. 373-6; He HEISE y col. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic antitumoral efficacy. Nature Medicine. 2000, vol.6, no.10, p. 1134-9; WO 94/18992). Por consiguiente, este virus se puede utilizar para infectar y exterminar de manera selectiva células neoplásicas con déficit de p53. Un experto en la técnica también puede mutar e interrumpir el gen inhibidor p53 en adenovirus 5 u otros virus de acuerdo con técnicas establecidas. En la presente invención también pueden utilizarse vectores adenoviricos delecionados en la región de unión a Rb E1A. Por ejemplo, el virus Delta24, que es un adenovirus mutante que lleva una deleción de 24 pares de bases en la región E1A (FUEYO y col. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. Oncogene. 2000, vol.19, no.1, p.2-12). El virus Delta24 tiene una deleción en la región de unión a Rb y no se une a Rb. Por lo tanto, en una célula normal, la replicación del virus mutante está inhibida por Rb. Sin embargo, si Rb está inactivado y la célula se vuelve neoplásica, Delta24 ya no se inhibe. En lugar de eso, el virus mutante se replica de manera eficaz y produce la lisis de la célula con deficiencia en Rb.

Un vector adenovirico de acuerdo con la presente invención se puede generar *in vitro* en Escherichia coli (E. coli) por ligamiento o recombinación homóloga (véase, por ejemplo, la publicación internacional WO 96/17070) o además por recombinación en una línea celular de complementación.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el vector comprende además los elementos necesarios para la expresión del anticuerpo de acuerdo con la invención.

Los elementos necesarios para la expresión consisten en todos los elementos que permiten que la secuencia de ácido nucleico se transcriba en ARN y que el ARNm se traduzca en un polipéptido. Estos elementos comprenden, en particular, un promotor que puede ser regulable o constitutivo. Naturalmente, el promotor es adecuado para el vector y para la célula huésped que se elige. Los ejemplos que se pueden mencionar son los promotores eucariotas de los genes *PGK* (fosfoglicerato quinasa), *MT* (metalotioneína; MCIVOR. Human purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase: gene transfer into cultured cells and murine hematopoietic stem cells by using recombinant amphotropic retroviruses. Molecular and cellular biology. 1987, vol.7, no.2, p.838-46), α -1 antitripsina, CFTR, tensoactivo, inmunoglobulina, actina (TABIN y col. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Molecular and cellular biology. 1982, vol.2, no.4, p. 426-36) y SR α (TAKEBE y col. SR alpha promoter an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Molecular and cellular biology. 1988, vol.8, no.1, p.466-72), el promotor temprano del virus SV40 (virus de simio), la LTR del RSV (virus de sarcoma de Rous), el promotor TK del HSV-1, el promotor temprano del virus CMV (Citomegalovirus), los promotores p7.5K pH5R, pK1 L, p28 y p11 del virus variolovacunal, promotores quiméricos tales como p11K7.5 y los promotores adenoviricos E1A y MLP. El promotor también puede ser un promotor que estimule la expresión en un tumor o célula cancerosa. Se puede hacer una mención particular de los promotores del gen *MUC-1*, que se sobreexpresa en cánceres de mama y próstata (CHEN y col. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. The Journal of clinical investigation. 1995, vol.96, no.6, p.2775-82), del gen *CEA* (que significa antígeno carcinoembrionario), que se sobreexpresa en cánceres de colon (SCHREWE y col. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. Molecular and cellular biology. 1990, vol.10, no.6, p. 2738-48), del gen de la tirosinasa, que se sobreexpresa en melanomas (VILE y col. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. Cancer res. 1993, vol.53, no.17, p.3860-4), del gen *ERBB-2*, que se sobreexpresa en cánceres de mama y pancreáticos (HARRIS y col. Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. Gene therapy. 1994, vol.1, no.3, p.170-5) y del gen de la α -fetoproteína, que se sobreexpresa en cánceres de hígado (KANAI y col. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. Cancer res. 1997, vol.57, no.3, p.461-5.). En particular, el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) es muy preferido.

Sin embargo, cuando se utiliza un vector que procede de un virus variolovacunal (como por ejemplo un vector MVA), el promotor del gen 7.5K de la timidina quinasa y el promotor pH5R son particularmente preferidos.

Los elementos necesarios pueden incluir además elementos adicionales que mejoran la expresión de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o su mantenimiento en la célula huésped. En particular pueden mencionarse secuencias intrónicas, secuencias señal de secreción, secuencias de localización nuclear, sitios internos para el reinicio de la traducción de tipo IRES, secuencias poli A de terminación de la transcripción, líderes tripartitos y orígenes replicación. Estos elementos son conocidos para los expertos en la técnica. Entre las secuencias señal de secreción, se prefieren particularmente las secuencias que codifican los polipéptidos que se exponen en la SEQ ID NO 5 y/u 8.

El vector recombinante de acuerdo con la invención también puede comprender uno o más genes de interés adicionales, siendo posible colocar estos genes bajo el control de los mismos elementos reguladores (casete policistrónico) o de elementos independientes. Los genes que pueden mencionarse particularmente son los genes que codifican interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, quimiocinas tales como CCL19, CCL20, CCL21, CXCL-14, interferones, factor de necrosis tumoral (TNF), y factores que actúan sobre la inmunidad innata y la angiogénesis (por ejemplo PAI-1, que significa inhibidor del activador de plasminógeno). En una realización particular, el vector recombinante de acuerdo con la invención comprende el gen de interés que codifica IL-2.

La presente invención también se refiere a una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. En una realización preferida, la célula de acuerdo con la invención, es una célula eucariota y más preferentemente una célula de mamífero. Las células de mamífero disponibles como huéspedes para expresión son muy conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas, tales como, pero sin limitación, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), células de riñón de crías de hámster (BHK) y muchas otras. Otras células eucariotas adecuadas incluyen células de levadura y otras fúngicas.

La presente invención también se refiere a un proceso para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, que comprende cultivar la célula de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo y purificar el anticuerpo de la célula o de un medio que rodea la célula.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera del anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico o el vector de acuerdo con la invención y un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además un compuesto de interés.

El transportador farmacéuticamente aceptable es preferentemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y tiene una resistencia iónica relativamente baja, tal como por ejemplo, una solución de sacarosa. Además, dicho transportador puede contener cualquier solvente, o líquido acuoso o parcialmente acuoso, tal como agua estéril apirógena. El pH de la composición farmacéutica, se ajusta además, y se tampona para satisfacer los requisitos de uso *in vivo*. La composición farmacéutica también puede incluir un diluyente, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable, así como agentes de solubilización, estabilización y conservación. Para administración inyectable, se prefiere una formulación en solución isotónica, acuosa o no acuosa. Se puede proporcionar en una sola dosis o en dosis múltiples en forma líquida o deshidratada (polvo, liofilizado y similar) que pueden reconstituirse en el momento del uso como un diluyente adecuado.

La presente divulgación también se refiere a un kit de partes que comprende (i) una composición farmacéutica, un anticuerpo, una secuencia de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención y, (ii) un compuesto de interés.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "compuesto de interés" se refiere a un compuesto terapéutico y preferentemente a un agente terapéutico para el cáncer o un compuesto útil en el tratamiento de disminución de masa ósea.

De acuerdo con una realización preferida, el agente terapéutico para el cáncer se elige del grupo que comprende Abraxano (Formulación de Nanopartículas estabilizada con Albúmina Paclitaxel), Adriamicina (Clorhidrato de Doxorrubicina), Adrucil (Fluorouracilo), Aldara (Imiquimod), Alemtuzumab, Alimta (Disodio de Pemetrexed), Acido Aminolevulínico, Anastrozol, Aprepitant, Arimidex (Anastrozol), Aromasin (Exemestano), Arranon (Nelarabina), Trióxido de Arsénico, Avastina (Bevacizumab), Azacitidina, Bevacizumab, Bexaroteno, Bortezomib, Campat (Alemtuzumab), Camptosar (Clorhidrato de Irinotecán), Capecitabina, Carboplatino, Cetuximab, Cisplatino, Clafen (Ciclofosfamida), Clofarabina, Clofarex (Clofarabina), Clolar (Clofarabina), Ciclofosfamida, Citarabina, Citosar-U (Citarabina), Citoxan (Ciclofosfamida), Dacogen (Decitabina), Dasatinib, Decitabina, DepoCyt (Citarabina Liposomal), DepoFoam (Citarabina Liposomal), Clorhidrato de Dexrazoxano, Docetaxel, Doxil (Liposoma de Clorhidrato de Doxorrubicina), Clorhidrato de Doxorrubicina, Dox-SL (Liposoma de Clorhidrato de Doxorrubicina), Efadex (Fluorouracil), Ellence (Clorhidrato de Epirubicina), Eloxatin (Oxaliplatino), Emend (Aprepitant), Clorhidrato de Epirubicina, Erbitux (Cetuximab), Clorhidrato de Erlotinib, Evacet (Liposoma de Clorhidrato de Doxorubicin), Evista (Clorhidrato de Raloxifeno), Exemestano, Faslodex (Fulvestrant), Femara (Letrozol), Fluoroplex (Fluorouracil), Fluorouracilo, Fulvestrant, Gefitinib, Clorhidrato de Gemcitabina, Ozogamicin de Gemtuzumab, Gemzar (Clorhidrato de Gemcitabina), Gleevec (Mesilato de Imatinib), Herceptin (Trastuzumab), Hycamtin (Clorhidrato de Topotecán),

Mesilato de Imatinib, Imiquimod, Iressa (Gefitinib), Clorhidrato de Irinotecan, Ixabepilona, Ixemptra (Ixabepilona), Keoxifeno (Clorhidrato de Raloxifeno), Kepivance (Palifermin), Ditosilato de Lapatinib, Lenalidomida, Letrozol, Levulan (Ácido Aminolevulínico), LipoDox (Liposoma de Clorhidrato de Doxorubicina), Citarabina Liposomal, Metazolastona (Temozolomida), Metotrexato, Milosar (Azacitidina), Milotarg (Ozogamicin de Gentuzumab), Paclitaxel de Nanopartícula (Formulación de Nanopartícula Estabilizada por Albúmina de Paclitaxel), Nelarabina, Neosar (Ciclofosfamida), Nexavar (Tosilato de Sorafenib), Nilotinib, Nolvadex (Citrato de Tamoxifen), Oncaspar (Pegaspargasa), Oxaliplatino, Paclitaxel, Formulación de Nanopartícula Estabilizada por Albúmina de Paclitaxel, Palifermin, Panitumumab, Paraplat (Carboplatino), Paraplatino (Carboplatino), Pegaspargasa, Disodio de Pemetrexed, Platinol-AQ (Cisplatino), Platinol (Cisplatino), Clorhidrato de Raloxifeno, Revlimid (Lenalidomida), Rituxan (Rituximab), Rituximab, Aerosol Intrapleural de Esclerol (Talco), Tosilato Sorafenib, Spricel (Dasatinib), Polvo de Talco Estéril (Talco), Esteritalco (Talco), Malato de Sunitinib, Sutent (Malato de Sunitinib), Sinovir (Talidomida), Talco, Citrato de Tamoxifeno, Tarabina PFS (Citarabina), Tarceva (Clorhidrato de Erlotinib), Targretin (Bexaroteno), Tassigna (Nilotinib), Taxol (Paclitaxel), Taxotere (Docetaxel), Temodar (Temozolomida), Temozolomida, Temsirolimus, Talomid (Talidomida), Talidomida, Totect (Clorhidrato de Dexrazoxano), Clorhidrato de Topotecan, Torisel (Temsirrolimus), Trastuzumab, Trisenox (Trióxido Arsénico), Tykerb (Ditosilato de Lapatinib), Vectibix (Panitumumab), Velcade (Bortezomib), Vidaza (Azacitidina), Vorinostat, Xeloda (Capecitabina), Zinecard (Clorhidrato de Dexrazoxano), Acido Zoledrónico, Zolinza (Vorinostat) y Zometa (Acido Zoledrónico).

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el compuesto útil en el tratamiento de disminución de masa ósea es un bifosfonato, un modulador selectivo de receptores de estrógeno (SERM), una hormona paratiroidea (PTH) (por ejemplo, teriparatida (Forteo)), ranelato de estroncio, Denosumab o calcitonina, o una combinación de los mismos. De acuerdo con una realización más preferida, el bifosfonato se elige del grupo que comprende Alendronato (Fosamax, Fosamax Plus D), Etidronato (Didronel), Ibandronato (Boniva), Pamidronato (Aredia), Risedronato (Actonel, Actonel W/Calcio), Tiludronato (Skelid) y ácido Zoledrónico (Reclast, Zometa). De acuerdo con una realización más preferida, los SERM se eligen del grupo que comprende raloxifeno (Evista), bazedoxifeno/premarin (Aprelal) y tamoxifeno.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades asociadas con una actividad aumentada de osteoclastos. Dichas enfermedades comprenden, pero sin limitación, endocrinopatías (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, desnutrición), enfermedades crónicas (síndromes de mala absorción, insuficiencia renal crónica (osteodistrofia renal), enfermedad hepática crónica (osteodistrofia hepática), fármacos (glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), terapia de privación de andrógenos, terapia de inhibidor de aromatasa, heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (osteogénesis imperfecta, homocistinuria), osteoporosis, osteopetrosis, inflamación de huesos asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa y/o enfermedad de Paget.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades asociadas con inflamación y/o autoinmunidad. Dichas enfermedades comprenden, pero sin limitación, espondiloartropatía seronegativa (artritis sorriásica, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, espondiloartropatía asociada con enfermedad inflamatoria intestinal), aflojamiento de articulación protésica, enfermedades de tejido conectivo (artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES) y nefritis lúpica, escleroderma, síndrome de Sjogren, enfermedad mixta de tejido conectivo, polimiositis, dermatomiositis), enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa), enfermedad de Whipples, artritis asociada con ileocolitis granulomatosa, afecciones cutáneas inflamatorias (pénfigo ampolloso autoinmunitario, pénfigo vulgar autoinmunitario, eczema, dermatitis), enfermedad pulmonar inflamatoria (alveolitis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, asma, bronquitis, bronquiolitis obliterante), enfermedad renal inflamatoria (glomerulonefritis, rechazo de aloinjerto renal, inflamación de túbulos renales), aterosclerosis, vasculitis sistémica (arteritis temporal/arteritis de células gigantes, arteritis de Takayasu, poliarteritis nodosa, enfermedad de Kawasaki, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg Strauss, poliangeitis microscópica, glomerulonefritis necrotizante, púrpura de Henoch Schonlein, vasculitis crioglobulinémica esencial y otras vasculitis de vasos pequeños, enfermedad de Behcets), enfermedades de activación de macrófagos (síndrome de activación de macrófagos (SAM), enfermedad de Stills de aparición en adultos, síndrome macrofagocítico), polimialgia reumática, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple (EM), síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Addison y/o fenómeno de Raynaud, síndrome de Goodpasture.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de cáncer.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" se refiere, pero sin limitación, adenocarcinoma, adenocarcinoma de célula acínica, carcinomas corticales adrenales, carcinoma de célula de alveolo, carcinoma anaplásico, carcinoma carcinoma basaloide, carcinoma de células basales, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma renaladinal, carcinoma embrionario, carcinoma anometroide, carcinoma hepatocelular fibrolaminar, carcinomas foliculares, carcinomas de células gigantes, carcinoma hepatocelular, carcinoma intraepidérmico,

5 carcinoma intraepitelial, carcinoma leptomanigio, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma meningual, carcinoma mesometonéfrico, carcinoma indiferenciado microcelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándulas salivales, carcinoma de células transicionales, carcinoma de células tubulares, sarcoma ameloblástico, sarcoma angiolítico, sarcoma botrioideo, sarcoma de estroma endometrial, sarcoma de Ewing, sarcoma fascicular, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma inmunoblástico, sarcoma osteogénico yuxtacortical, sarcoma de Coppices, sarcoma leucocítico (leucemia), sarcoma linfático (linfosarcoma), sarcoma medular, sarcoma mieloideo (sarcoma granulocítico), sarcoma austiogenci, sarcoma perioesteal, sarcoma de células del retículo (linfoma histiocítico), sarcoma de células redondas, sarcoma de células fusiformes, sarcoma sinovial, sarcoma audiogénico telangiectático, linfoma de Burkitt, NPDL, NML, NH y linfomas difusos. De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención se dirige al tratamiento de cáncer metastásico óseo, en el que el cáncer metastásico es cancer de mama, de pulmón, renal, mieloma múltiple, cancer tiroideo, de próstata, adenocarcinoma, neoplasias de células sanguíneas, incluyendo leucemia y linfoma; cáncer de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, incluyendo cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer del conducto biliar o de vesícula; neoplasias del tracto genital femenino, incluyendo carcinoma de ovario, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, y cáncer de cuello uterino; cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, incluyendo neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, incluyendo melanoma maligno o cáncer de células escamosas.

20 La presente divulgación se refiere además a un procedimiento para mejorar el tratamiento de un paciente con cáncer que se está sometiendo a un tratamiento quimioterapéutico con un agente terapéutico para el cáncer, que comprende el tratamiento simultáneo de dicho paciente junto con un procedimiento como el desvelado anteriormente.

La presente divulgación se refiere además a un procedimiento para mejorar la efectividad citotóxica de fármacos citotóxicos o radioterapia que comprende el tratamiento simultáneo de un paciente que necesite dicho tratamiento junto con un procedimiento como el desvelado anteriormente.

25 La presente divulgación se refiere además a un procedimiento para mejorar el tratamiento de un paciente con una enfermedad asociada a una actividad aumentada de osteoclastos, que se está sometiendo a un tratamiento con un bifosfonato, un modulador selectivo de receptores de estrógeno (SERM), una hormona paratiroidea (PTH) (por ejemplo, teriparatide (Forteo)), ranelato de estroncio, Denosumab o calcitonina, o una combinación de los mismos, que comprende el tratamiento simultáneo de dicho paciente junto con un procedimiento como el desvelado anteriormente.

35 En otra realización, se contempla el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar cáncer metastásico óseo en un paciente que padece de cáncer metastásico. En una realización relacionada, el cáncer metastásico es cancer de mama, de pulmón, renal, mieloma múltiple, cancer tiroideo, de próstata, adenocarcinoma, neoplasias de células sanguíneas, incluyendo leucemia y linfoma; cáncer de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, incluyendo cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer del conducto biliar o de vesícula; neoplasias del tracto genital femenino, incluyendo carcinoma de ovario, cánceres endometriales uterinos, cáncer vaginal, y cáncer de cuello uterino; cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, incluyendo neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, incluyendo melanoma maligno o cáncer de células escamosas.

40 De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento.

45 De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que tiene cáncer.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que tiene una enfermedad asociada con una actividad aumentada de osteoclastos.

50 De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria, más específicamente una enfermedad inflamatoria intestinal.

55 De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente que padece artritis reumatoide.

La administración del anticuerpo, de la secuencia de ácido nucleico, del vector, de la composición farmacéutica o del kit de partes de acuerdo con la invención puede efectuarse por cualquier medio conocido para el experto en la

técnica. Las vías de administración preferidas incluyen, pero sin limitación, la administración intradérmica, subcutánea, oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación ocular, vaginal y rectal. De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico, el vector, la composición farmacéutica o el kit de partes de acuerdo con la invención se suministran por vía sistémica.

- 5 La administración puede llevarse a cabo en una sola dosis o en una dosis repetida una o varias veces después de un intervalo de tiempo determinado. De manera deseable, el anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico, el vector, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administran de 1 a 10 veces a intervalos semanales.

Para una orientación general, la dosis adecuada para el anticuerpo es de aproximadamente 2 mg/kg a 30 mg/kg, de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg o de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. La dosificación adecuada para el vector de acuerdo con la invención varía de aproximadamente 10^4 a 10^{10} ufp (unidades formadoras de placa), deseablemente de aproximadamente 10^5 y 10^8 ufp para el vector de MVA, mientras que ésta varía de aproximadamente 10^5 a 10^{13} ui (unidades infecciosas) deseablemente de aproximadamente 10^7 y 10^{12} para vectores a base de adenovirus. Se puede administrar una composición a base de plásmidos de vectores en dosis de entre 10 µg y 20 mg, convenientemente entre 100 µg y 2 mg.

- 15 Cuando el uso, o el procedimiento de acuerdo con la invención, es para el tratamiento de cáncer, el procedimiento o uso de la invención se puede llevar a cabo junto con una o más modalidades terapéuticas convencionales (por ejemplo radiación, quimioterapia y/o cirugía). El uso de estrategias terapéuticas múltiples proporciona al paciente una intervención con una base más amplia. En una realización, el procedimiento de la presente invención puede ir precedido o seguido de intervención quirúrgica. En otra realización, puede ir precedido o seguido de radioterapia (por ejemplo, radiación gamma). Los expertos en la técnica pueden formular fácilmente protocolos y parámetros de radioterapia adecuados que pueden utilizarse (por ejemplo PEREZ. Principles and practice of radiation oncology. 2ª edición. LIPPINCOTT, 1992).

Breve Descripción de las Figuras

- 25 La figura 1, ilustra la tinción específica de células NIH/3T3 transfectadas con CSF-1 mediante el mAb CXIIIG6.
La figura 2, muestra la inhibición de la unión de CSF-1 a CSF-1R en la superficie celular en presencia del mAb CXIIIG6.
La figura 3, muestra el bloqueo específico de CSF-1R humano soluble mediante el mAb CXIIIG6 ("ctrl" significa control; "SN neg" significa sobrenadante de hibridoma de control negativo).
La figura 4, muestra la inhibición de la diferenciación de osteoclastos humanos y la secreción de la metaloproteasa 9 de la matriz (MMP-9) en presencia del mAb CXIIIG6 ("ctrl" significa control; "SN CXIIIG6" significa sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6; "SN neg" significa sobrenadante hibridoma de control negativo).
La figura 5, muestra la reactividad no cruzada del mAb CXIIIG6 con otros receptores de tirosina quinasa que tienen homología con CSF-1R ("SN" significa sobrenadante de hibridoma).
La figura 6, muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 2) de la cadena pesada de CXIIIG6. Las secuencias cebadoras, incluyendo los sitios de restricción para la clonación añadidos a las secuencias de nucleótidos están subrayadas. Los sitios de restricción se muestran subrayados en cursiva. Las secuencias de aminoácidos de los dominios V se resaltan en negrita.
La figura 7, muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 4) de la cadena ligera de CXIIIG6. Las secuencias cebadoras, incluyendo los sitios de restricción para la clonación añadidos a las secuencias de nucleótidos están subrayadas. Los sitios de restricción se muestran subrayados en cursiva. Las secuencias de aminoácidos de los dominios V se resaltan en negrita.
La figura 8 muestra la construcción del plásmido pTG17753.
La figura 9 muestra la construcción del plásmido pTG17727.
La figura 10 muestra la construcción del plásmido pOptiVEC™.
La figura 11 muestra la construcción del plásmido pTG17895.
La figura 12, muestra la construcción del plásmido pTG17812.
La figura 13 muestra la construcción del plásmido pTG17868.
La figura 14 muestra la construcción del plásmido pTG17869.
La figura 15 muestra las variantes de la cadena ligera del CXIIIG6 humanizado.
La figura 16 muestra las variantes de la cadena pesada de la IgG1 CXIIIG6 humanizada.
La figura 17 muestra el bloqueo específico del CSF-1R humano a través del CXIIIG6 murino recombinante y de la IgG1 CXIIIG6 quimérica.
La figura 18 muestra la inhibición de la diferenciación de osteoclastos humanos y la secreción de la metaloproteasa 9 de la matriz (MMP-9) en presencia del CXIIIG6 murino recombinante y de la IgG1 CXIIIG6 quimérica.

Modo (s) para llevar a cabo la Invención

Tinción específica de células NIH/3T3 transfectadas con CSF-1R mediante el mAb CXIIIG6

Se generó la línea celular B4-800-5 mediante transfección estable de células NIH/3T3 con un plásmido de expresión que codificaba el CSF-1R humano de longitud completa. La expresión del CSF-1R en la superficie celular en células

B4-800-5 se verificó mediante inmunotinción indirecta con los mAb anti-CSF-1R humano 61701 (IgG₁ de ratón, R&D Systems) o 2-4A5-4 (IgG_{-1,k} de rata, GeneTex), en comparación con controles de isotipo (figura 1, paneles superior y central). Se utilizaron sobrenadantes de cultivo del hibridoma CXIIIG6 o de un hibridoma de control negativo para la inmunotinción de las células B4-800-5 o de las células NIH/3T3 parentales (figura 1, paneles inferiores).

- 5 El análisis de citometría de flujo mostró que el sobrenadante de cultivo del hibridoma CXIIIG6 tiñó de manera selectiva las células B4-800-5, demostrando la especificidad del mAb por el CSF-1R en la superficie celular.

Inhibición de la unión de CSF-1 con CSF-1R en la superficie celular

10 Se incubaron 3×10^5 células THP-1 (línea celular de leucemia monocítica positiva al CSF-1R humano) durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C en presencia de cualquiera de: sobrenadantes de cultivo de hibridoma, suero de un ratón virgen o inmunizado con anti-CSF-1R (dilución 1:1000), mAb anti-CSF-1R 2-4A5-4 (GeneTex) o una IgG₁ de rata de control (10 µg/ml), o sin reactivo. Después de dos lavados con PBS frío, las células se incubaron durante 30 minutos con 1 µg/ml de CSF-1 humano recombinante biotinilado. Las células se lavaron dos veces y se incubaron adicionalmente durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C con 10 µg/ml de estreptavidina-Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Después de lavar con PBS y fijar con paraformaldehído al 4%, se analizó la tinción celular mediante citometría de flujo.

15 Las intensidades de fluorescencia disminuidas en comparación con las muestras de control, reflejan la inhibición de la unión de CSF-1 con CSF-1R en la superficie celular. El suero de un ratón inmunizado con CSF-1R, bloquea la unión de CSF-1 con células THP-1 (figura 2). Aunque el sobrenadante del hibridoma de control negativo o un mAb irrelevante no mostró efecto, el sobrenadante de cultivo del hibridoma de CXIIIG6 inhibe la unión de CSF-1 con células THP-1 (figura 2, panel derecho inferior), como lo hace el mAb 2-4A5-4 (panel izquierdo inferior).

20 Localización del sitio de unión del mAb CXIIIG6

25 Para identificar el sitio de unión del mAb CXIIIG6 en el CSF-1R, se llevó a cabo una transferencia Western utilizando formas solubles del CSF-1R humano que comprendía cualquiera de los cinco dominios de tipo inmunoglobulina extracelulares (Met 1 a Glu 512, R&D Systems) o únicamente los tres dominios de tipo inmunoglobulina N-terminal de la región extracelular de CSF-1R (Met 1 a Ser 290), ambos fusionados en sus extremos C-terminal a la región Fc de una IgG₁ humana. Como control negativo se utilizó una forma soluble del EGFR fusionado al Fc de IgG₁ humano (R&D Systems).

30 Cien nanogramas de cada receptor soluble se sometieron a electroforesis en condiciones naturales antes de transferirse a una lámina de nitrocelulosa y de explorarlos con cualquiera de sobrenadantes de hibridoma, pAb c-fms/CSF-1R H300 de conejo (Santa Cruz Biotechnology), mAb 61701 de ratón (R&D Systems) o suero de ratones vírgenes o inmunizados con CSF-1R.

35 Ambas formas solubles del CSF-1R se detectaron como bandas amplias cuando se exploraron con pAb c-fms/CSF-1R H300, mAb 61701 o suero del ratón inmunizado. No se observaron señales detectables con suero de ratón virgen o con un sobrenadante de hibridoma de control negativo. El sobrenadante de hibridoma CXIIIG6 reconoció CSF-1R₁₋₂₉₀:Fc así como CSF-1R₁₋₅₁₂:Fc, pero no EGFR:Fc, indicando que CXIIIG6 se une específicamente a un epítipo que se encuentra dentro de los tres dominios de tipo inmunoglobulina N-terminal (entre los restos 1 a 290) del CSF-1R humano.

Bloqueo específico del CSF-1R humano mediante el mAb CXIIIG6

40 Para evaluar la actividad de bloqueo del sobrenadante de hibridoma CXIIIG6 en el CSF-1R de ser humano y de murino se utilizó la línea celular M-NFS-60 de leucemia mieloide murina dependiente de CSF-1 (n° CRL-1838, ATCC). Previamente se incubaron cinco nanogramas del CSF-1R humano soluble (CSF-1R₁₋₅₁₂:Fc de R&D Systems) en microplacas blancas de 96 pocillos con diluciones en serie de cualquiera de los sobrenadantes de hibridoma, el mAb 61701 (R&D Systems) o el mAb de control de isotipo murino. Después, se añadieron células 10E4 M-NFS-60 cultivadas durante la noche en la ausencia de CSF-1, a los pocillos de cultivo junto con 0,1 ng de CSF-1 humano en un volumen de ensayo final de 100 µl. Los cultivos se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37 °C y la proliferación se cuantificó con la incorporación de BrdU utilizando un ELISA de Proliferación Celular (Roche).

45 El CSF-1R humano soluble, inhibió completamente la proliferación de las células M-NFS-60 mediada por el CSF-1 humano, como se muestra en presencia del sobrenadante de hibridoma negativo que contiene o no una IgG₁ de control negativo (figura 3; promedio +/- ETM de 3 pocillos). En cambio, tanto el sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6 como el mAb 61701 de control positivo tuvieron la capacidad de restaurar la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis, lo que muestra que tuvieron la capacidad de neutralizar el CSF-1R humano soluble.

55 En este ensayo, la proliferación activa de células M-NFS-60 en presencia de bajas diluciones de sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6, mostró que el mAb CXIIIG6 no tuvo la capacidad de bloquear el CSF-1R murino expresado por células M-NFS-60. Además, en un ensayo de proliferación de M-NFS-60 mantenido con CSF-1 murino, llevado a

cabo en ausencia de CSF-1R soluble, el tratamiento con el mAb AFS98, anti-CSF-1R de ratón (eBioscience) dio como resultado una disminución drástica del crecimiento celular dependiente de la concentración (datos no mostrados). El sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6, al igual que los anticuerpos de control negativo y el sobrenadante de hibridoma negativo, no causó reducción en la proliferación celular. Estos resultados demuestran que el mAb CXIIIG6 se dirige específicamente al CSF-1R humano.

Inhibición de la diferenciación de osteoclastos humanos y de la secreción de la metaloproteasa 9 de la matriz (MM-9)

Se generaron osteoclastos de monocitos humanos obtenidos por decantación de CMSP de un donante de sangre sano. Resumiendo, se sembraron monocitos a 2×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron durante 45 minutos con cualquiera de sobrenadantes de cultivo de hibridoma, los mAb anti-CSF-1 humano 61701 (R&D Systems) o 2-4A5-4 (GeneTex), el mAb anti-CSF-1 humano 26730 (R&D Systems), controles de isotipo de murino o de rata, o sueros de ratones vírgenes e inmunizados con CSF-1R diluidos en medio de cultivo de hibridoma. Se agregó medio α -MEM a los pocillos de cultivo con o sin CSF-1 y RANKL humano (PeproTech, 25 y 40 ng/ml respectivamente). Cada 3 días, durante 9 días, se reponían los sobrenadantes de hibridoma, los mAb y/o el medio con o sin citocinas. El día 9 se recogieron sobrenadantes de cultivo acondicionado y se ensayaron con respecto a la MMP-9 humana total utilizando un ensayo ELISA (R&D Systems). La formación de osteoclastos se evaluó con tinción de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) utilizando el kit de fosfatasa ácida leucocitaria de Sigma-Aldrich.

El CSF-1 + RANKL indujo la diferenciación de monocitos en osteoclastos, definidos como células positivas a TRAP multinucleadas grandes, mientras que no se obtuvieron osteoclastos positivos a TRAP en ausencia de citocinas. La adición de 0,5 μ g/ml del mAb 26730 anti-CSF-1 anuló completamente la diferenciación de osteoclastos, como se muestra mediante la ausencia de secreción de MMP-9. Los mAb anti-CSF-1R 61701 ó 2-4A5-4 a la misma concentración y el suero de ratón inmunizado (dilución 1:1000) inhibió la formación de osteoclasto solo parcialmente (figura 4; con (+) o sin (-) citocinas; promedio +/- DTM de 3 pocillos; *: promedio de 2 pocillos). El tratamiento con el sobrenadante de cultivo de hibridoma de CXIIIG6 diluido 1:20 o 1:100 redujo significativamente el nivel de producción de MMP-9, en comparación con dos sobrenadantes de hibridoma de control negativo (A, B). Estos resultados demuestran que el mAb CXIIIG6 inhibe la diferenciación de osteoclastos de monocitos humanos bloqueando la función del CSF-1R en la superficie celular.

Inhibición de la fosforilación de CSF-1R dependiente de CSF-1

Para investigar el efecto del sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6 sobre la fosforilación de CSF-1R dependiente de CSF-1, se utilizó la línea celular B4-800-5 obtenida mediante transfección estable de células NIH/3T3 con un CSF-1R humano que expresaba un plásmido. Las células se sembraron a 2×10^5 células por placa de Petri de 60 mm y se cultivaron durante 48 a 72 horas. Después de privarlas de suero durante 1 hora a una temperatura de 37 °C, las células se trataron durante 1 hora a una temperatura de 37 °C con un medio de cultivo que contenía cualquiera de sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6, el mAb 2-4A5-4 (NeoMarkers) o los mAb de control de isotipo (diluido en sobrenadante de hibridoma negativo) y posteriormente se estimularon con hCSF-1 100 ng/ml o se dejaron sin estimular durante 5 minutos a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se efectuó la lisis de las capas celulares y se extrajeron las proteínas totales. Se analizaron 10 μ g de proteínas explorando con transferencias Western con cualquiera de pAb o c-fms/CSF-1R H300 de conejo o pAb p-c-fms/CSF-1R (Tyr708)-R de conejo (Santa Cruz Biotechnology), seguido de inmunoglobulinas^{HRP} anti-conejo de cabra.

En ausencia de CSF-1, ni el sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6 ni el mAb 2-4A5-4 indujeron la fosforilación del receptor, como se puede observar con el anticuerpo específico para el CSF-1R fosforilado en la posición 708, lo que muestra que el mAb CXIIIG6 solo no ejerce un efecto agonista. Después de la estimulación con CSF-1, la cantidad de CSF-1R disminuyó en las células tratadas con control de isotipo en comparación con las células no estimuladas, y el CSF-1R se fosforiló en Tyr708 (datos no mostrados). El tratamiento previo con sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6 o con el mAb 2-4A5-4 no mejoró la desaparición de CSF-1R. La fosforilación de CSF-1R disminuyó después de tratamiento con sobrenadante de hibridoma de CXIIIG6 o con el mAb 2-4A5-4. Estos resultados muestran que el mAb CXIIIG6 tiene la capacidad de bloquear la fosforilación de CSF-1R dependiente de CSF-1.

Reactividad cruzada del mAb CXIIIG6

La reactividad cruzada del mAb CXIIIG6 se ensayó con un ELISA en una serie de receptores solubles purificados que pertenecían a la subfamilia de receptores de tirosina quinasa de tipo III y que mostraban homología con el CSF-1R en sus dominios de tipo Ig extracelulares: el VEGFR-1, VEGFR-2, Flt-3 y PDGFR β solubles (los cuatro expresados como proteínas de fusión Fc), así como el PDGFR α y SCFR (c-kit) se obtuvieron en R&D Systems y se utilizaron para revestir una placa de ensayo ELISA. El EGFR soluble (R&D Systems), de la subfamilia EGFR de receptores de tirosina quinasa se utilizó como un control negativo.

Los sobrenadantes de cultivo de cualquiera de un hibridoma de CXIIIG6 (SN CXIIIG6) o de un hibridoma de control negativo, o del anti-CSF-1R de ratón IgG₁ 61701 (R&D Systems) se incubaron en la placa de ensayo ELISA revestida a concentraciones de anticuerpo de 500 ng/ml. Después de lavar la placa ELISA, se revelaron los anticuerpos unidos utilizando anti-Ig de ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Sigma) y se midió la OD (450 -

540 nm). Los resultados ilustrados en la figura 5, muestran que al igual que el mAb 61701, el anticuerpo CXIIG6 se une fuertemente al CSF-1R mientras que no se detectó señal específica en ningún otro receptor de tirosina quinasa. Esto muestra que, entre los diversos receptores de tirosina quinasa de tipo III ensayados, el CXIIG6 es específico para el CSF-1R.

5 Construcción de vectores de expresión para el mAb CXIIG6

Para clonar los genes que codificaban las cadenas pesada y ligera de CXIIG6 para de producir el mAb CXIIG6 en la línea celular de mamífero DG44, se utilizó el kit OptiCHO™ Antibody Express (Invitrogen, Catálogo No. 12762-019). Este kit incluye: (1) el vector pOptiVEC™, un plásmido bicistrónico que permite la clonación del gen de interés aguas abajo del promotor del citomegalovirus, CMV. La transcripción del gen de interés se separa de la del marcador de selección auxotrófico de reductasa de la dihidrofolato reductasa (DHFR) mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que permite la transcripción del gen de interés y del marcador de selección en el mismo ARNm; (2) El vector pcDNA™3.3 que permite la clonación del gen de interés aguas abajo del promotor del CMV. El pcDNA™3.3 contiene un gen de resistencia a neomicina que permite la selección utilizando Geneticin®. Los vectores pOptiVEC™ y pcDNA™3.3 contienen la secuencia TK poli-A que dirige el procesamiento adecuado del extremo 3' del ARNm del gen de interés.

Se sintetizaron cebadores específicos (véase la tabla 4) y se utilizaron para la amplificación por PCR y la clonación de todos los genes de cadena pesada y cadena ligera de CXIIG6 (respectivamente SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3; véase respectivamente la figura 6 y la figura 7). Los cebadores inversos incluyeron la secuencia consenso de Kozak para una traducción eucariota eficiente (KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res. 1987,15(20).

Tabla 4

Cebador	Secuencia
OTG 18929	GCCGCCACCATGTACTIONTGGGACTGAACTATGTATTC (SEQ ID NO: 30)
OTG 18930	GGAGATCTTCATTTACCCGGAGTCCGGGA (SEQ ID NO: 31)
OTG18931	GCCGCCACCATGAGTGTGCCACTCAGGTCCTG (SEQ ID NO: 32)
OTG 18932	GCCCGGGCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTC (SEQ ID NO: 33)

La cadena pesada de CXIIG6 se amplificó con PCR utilizando, como molde, los cebadores OTG18929 y OTG18930 con el plásmido pTG17753 (figura 8), y se clonó en los vectores pOptiVEC™-TOPO® (kit pOptiVEC™-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo no. 12744-017-01) y pcDNA™3.3-TOPO® (kit pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo no. K8300-01) para obtener respectivamente pTG17786 y pTG17789.

La cadena ligera de CXIIG6 se amplificó con PCR utilizando, como molde, los cebadores OTG18931 y OTG18932 con el plásmido pTG17727 (figura 9), y se clonó en los vectores pOptiVEC™-TOPO® (kit pOptiVEC™-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo no. 12744-017-01) y pcDNA™3.3-TOPO® (kit pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning®, Invitrogen, Catálogo no. K8300-01) para obtener pTG17788 y pTG17787 respectivamente.

La secuencia de nucleótidos del casete de expresión completo, incluyendo el promotor de CMV y la señal TK poliA de pTG17786, pTG17787, pTG17788 y pTG17789 se secuenciaron y encontraron en conformidad con sus secuencias teóricas.

Generación de anticuerpos quiméricos del mAb CXIIG6

35 Los dominios variables del mAb CXIIG6 se combinaron con regiones constantes humanas.

Para generar la cadena ligera quimérica (denominada cadena Igk quimérica de CXIIG6), se diseñó una secuencia teórica uniendo la secuencia codificante del dominio VK de CXIIG6 (de la SEQ ID NO: 3) con la secuencia codificante de la región IGKC humana (número de referencia del GenBank: J00241). Este fragmento de ADN XbaI NotI mantiene la misma secuencia no traducida en el extremo 5', incluyendo la secuencia de Kozak, como la que se utiliza en la versión murina (como en los pTG17787 y pTG17788 descritos anteriormente). La secuencia de la cadena ligera del CXIIG6 quimérico se optimizó por codones para su expresión en células CHO, se ensambó con oligonucleótidos sintéticos y se subclonó en el vector pOptiVEC™ (figura 10) mediante XbaI NotI con GeneArt AG. La secuencia de ácido nucleico optimizada por codones de cadena ligera de CXIIG6 quimérica obtenida (regiones variables y constantes) es como se expone en la SEQ ID NO: 34. El plásmido obtenido se denominó pTG17895 (figura 11).

Para generar las cadenas pesadas quiméricas de IgG1 e IgG4 (denominadas respectivamente cadenas de CXIIG6 IgG1 quimérica y CXIIG6 IgG4 quimérica), se diseñaron secuencias teóricas uniendo la secuencia codificante del dominio VH de CXIIG6 (de la SEQ ID NO: 1) con las secuencias codificantes de cualquiera de la región IGHG1C humana (número de referencia del GenBank: J00228) o de la región IGHG4C humana (número de referencia del

GenBank: K01316). Estos fragmentos de ADN *XbaI NotI* mantienen la misma secuencia no traducida en el extremo 5', incluyendo la secuencia de Kozak, como la utilizada en la versión murina (como en el pTG17786 y pTG17789 descritos anteriormente). Después, las cadenas pesadas de CXIIIG6 quiméricas se optimizaron por codones para su expresión en células CHO, se sintetizaron y se clonaron en pTG17812 (figura 12) mediante *XbaI NotI* con GeneArt AG. La secuencia de ácido nucleico optimizada por codones de cadena pesada de la IgG1 CXIIIG6 quimérica obtenida (regiones variables y constantes), es como se expone en la SEQ ID NO: 35 y el plásmido obtenido se denominó pTG17868 (figura 13). La secuencia de ácido nucleico optimizada por codones de cadena pesada de la IgG4 CXIIIG6 quimérica obtenida (regiones variables y constantes) es como se expone en la SEQ ID NO: 36 y el plásmido obtenido se denominó pTG17869 (figura 14).

10 Generación de anticuerpos humanos del mAb CXIIIG6

Para generar las variantes de cadena ligera humanizada, se realizaron las sustituciones de aminoácido de acuerdo con la tabla 2 dentro de la región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9.

Las secuencias de ADN se diseñaron uniendo secuencias modificadas que contenían sustituciones del dominio VK de CXIIIG6 (de la SEQ ID NO: 3) con la secuencia que codifica la región IGKC humana (número de referencia del GenBank: J00241). Este fragmento de ADN *XbaI NotI* mantiene la misma secuencia no traducida en el extremo 5' incluyendo la secuencia de Kozak como la utilizada en la versión murina (como en pTG17787 y pTG17788 como se describió anteriormente). Después, las secuencias de cadena ligera de CXIIIG6 humanizada se optimizaron por codones para su expresión en células CHO, se ensamblaron con oligonucleótidos sintéticos y se clonaron en el vector pOptiVEC™ (figura 10) mediante *XbaI NotI* con GeneArt AG. En la figura 15 se indican las variantes de cadena ligera de CXIIIG6 humanizada y los plásmidos.

Para generar las variantes de cadena pesada humanizada, se realizaron las sustituciones de aminoácido de acuerdo con la tabla 1 dentro de la región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 6.

Las secuencias de ADN se diseñaron uniendo secuencias modificadas que contenían sustituciones del dominio VH de CXIIIG6 (de la SEQ ID NO: 1) con las secuencias que codifican la región IGHG1C humana (número de referencia del GenBank: J00228). Los fragmentos de ADN *XbaI ApaI* mantuvieron la misma secuencia no traducida en el extremo 5' incluyendo la secuencia de Kozak, como la utilizada en la versión murina (como en pTG17786 y pTG17789, como se describió anteriormente). Después, las secuencias de ADN se optimizaron por codones para su expresión en células CHO, se sintetizaron y se clonaron en pTG17812 (figura 12) mediante *XbaI ApaI* con GeneArt AG. En la figura 16 se indican las variantes de cadena pesada de la IgG1 CXIIIG6 humanizada y los plásmidos.

30 Actividades de inhibición *in vitro* del anticuerpo CXIIIG6 murino recombinante y de la IgG1 CXIIIG6 quimérica.

Para determinar si el anticuerpo CXIIIG6 murino recombinante purificado (como se describe previamente) y su variante IgG1 quimérica (IgG1 CXIIIG6 quimérica como se describió anteriormente) tenían la capacidad de bloquear el CSF-1R humano soluble, se realizaron estudios de respuesta a la dosis en los modelos de proliferación de células M-NFS-60 y de diferenciación de osteoclastos (como se describió anteriormente). La IgG2a murina policlonal purificada de Rockland (Rockland, 010-0141) y una IgG1 quimérica producida por el solicitante, se ensayaron en paralelo como anticuerpos de control. El efecto bloqueante se evaluó exponiendo las células a intervalos de concentración de anticuerpos anti-CSF-1R activos, medido a través de unión antigénica en un ensayo biosensor de RPS (resonancia de plasmón superficial). La comparación entre los mAb CXIIIG6 y su mAb de control respectivo, se realizó cargando las mismas cantidades de anticuerpo total (ensayo biosensor de RPS mediante unión a Fc).

Bioensayo con M-NFS-60: En el bioensayo con M-NFS-60, las células se trataron durante 48 horas con 0,23 ng/ml a 0,5 µg/ml de mAb CXIIIG6 activos (CXIIIG6 murino recombinante; IgG1 CXIIIG6 quimérica) o con concentraciones correspondientes de mAb de control en presencia de CSF-1R soluble humano 50 ng/ml y CSF-1 humano 1 ng/ml. Los resultados ilustrados en la figura 17 muestran que el crecimiento de las células M-NFS-60 aumentaba en respuesta a concentraciones en aumento de los dos mAb CXIIIG6 (CXIIIG6 murino recombinante; IgG1 CXIIIG6 quimérica) lo que demostraba que antagonizaron la unión del CSF-1R soluble con CSF-1 (promedio +/- DTM de pocillos por triplicado). La IgG1 CXIIIG6 fue tan efectiva como el CXIIIG6 murino recombinante restaurando la proliferación celular. La IgG2a murina de control y la IgG1 quimérica no tuvieron efecto en la neutralización de CSF-1 mediante el CSF-1R soluble sobre su intervalo de concentración respectivo.

Bioensayo con osteoclastos: En el bioensayo con osteoclastos, se incubaron monocitos humanos decantados durante 8 días con 0,85 ng/ml a 0,62 µg/ml de mAb CXIIIG6 activos (CXIIIG6 murino recombinante; IgG1 CXIIIG6 quimérico) en presencia de CSF-1 25 ng/ml (ImmunoTools) y RANKL 40 ng/ml. Los días 4 y 6, el medio y todos los agentes añadidos se reabastecieron y se midió la MMP-9 total en el medio de cultivo acondicionado del día 6 al 8. Los resultados ilustrados en la figura 18, muestran que, en comparación con los anticuerpos de control, cada uno de CXIIIG6 murino recombinante y su variante quimérica (IgG1 CXIIIG6 quimérica) redujeron significativamente la producción de MMP-9 que va en paralelo con la diferenciación de osteoclastos, indicando que se produjo un retraso del crecimiento (figura 18; promedio +/- DTM de pocillos por triplicado).

Considerados en su conjunto, estos resultados también demuestran que el CXIIIG6 murino recombinante y la IgG1 CXIIIG6 quimérica inhiben el CSF-1R humano soluble así como el de la superficie celular.

Referencias

- WO 01/30381
- WO 03/059395
- WO 2005/068503
- 5 • EP 1488792 A
- US 2005059113
- EP 901463 B
- EP 83286 A
- EP 206920 A
- 10 • US 5747323
- WO 94/28152
- WO 97/04119
- WO 94/18992
- WO 96/17070
- 15 • SHERR. Colony-stimulating factor-1 receptor. *blood*. 1990, vol.75, no.1, p.1-12
- HUME y col. Regulation of CSF-1 receptor expression. *Molecular reproduction and Development*. 1997, vol.46, no.1, p.46-52.
- SCHOLL y col. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6.
- 20 • CHAMBERS y col. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clinical Cancer Research*. 1997, vol.3, no.6, p.999-1007
- BAÏOCCHI y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. *Cancer*. 1991, vol.67, no.4, p.990-6
- 25 • KIRMA y col. Elevated expression of the oncogene c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor- 1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing c-fms expression. *Cancer res*. 2007, vol.67, no.5, p.1918-26.
- HEMMERLEIN y col. Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, c-fms, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2000, vol.49, no.9, p.485-92.
- 30 • IDE y col. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, vol.99, no.22, p.14404-9.
- RAMBALDI y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1988, vol.81, no.4, p.1030-5.
- 35 • SCHOLL y col. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6.
- TANG y col. M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumour cells: M-CSF mediated recruitment of tumour infiltrating monocytes? *Journal of cellular biochemistry*. 1992, vol.50, no.4, p.350-6.
- 40 • SCHOLL y col. Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer*. 1994, vol.69, no.2, p.342-6.
- SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83.
- 45 • DORSCH y col. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90.
- WANG y col. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology*. 1988, vol.141, no.2, p.575-9.
- 50 • FILDERMAN y col. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer res*. 1992, vol.52, no.13, p.3661-6.
- DORSCH y col. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90.
- SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83.
- 55 • BARON y col. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *Journal of cell science*. 2001, vol.114, no.pt5, p.999-1010.
- CECCHINI y col. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol.46, no.1, p.75-83.
- 60 • BRUZZANITI y col. Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine*. 2006, vol.7, no.1-2, p.123-39.
- CICEK y col. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer metastasis reviews*. 2006, vol.25, no.4, p.635-44.

- KITAURA y col. The journal of clinical investigation. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. 2005, vol.115, no.12, p.3418-27.
- MARSHALL y col. Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-I) leads to inhibition of DSS-induced colitis. Inflammatory bowel diseases. 2007, vol.13, no.2, p.219-24.
- 5 • JOSE y col. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. American journal of transplantation. 2003, vol.3, no.3, p.294-300.
- KUTZA y col. Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages. Journal of immunology. 2000, no.164, p. 4955-4960.
- 10 • SMITH y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, no.147, p.195-7.
- HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2ª edición. Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988.
- HAMMERLING y col. Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas. Nueva York: Elsevier, 1981. p. 563-681.
- SMITH y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, no.147, p.195-7.
- 15 • LENNARD. Standard protocols for the construction of scFv libraries. Methods in molecular biology. 2002, no.178, p. 59-71.
- POLJAK. Production and structure of diabodies. Structure. 1994, vol.2, no.12, p.1121-3.
- HUDSON y col. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. Journal of immunological methods. 1999, vol.231, no.1-2, p.177-89.
- 20 • KIPRIYANOV. Generation of bispecific and tandem diabodies. Methods in molecular biology. 2002, no.178, p.317-31.
- HOLLIGER y col. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature biotechnology. 2005, vol.23, no.9, p.1126-36.
- HOOGENBOOM y col. Natural and designer binding sites made by phage display technology. Immunology today. 2000, vol.21, no.8, p.371-8.
- 25 • MARKS y col. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. Biotechnology. 1992, vol.10, no.7, p.779-83.
- BARBAS y col. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994, vol.91, no.9, p.3809-13.
- 30 • SCHIER. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. Gene. 1996, vol.169, no.2, p.147-55.
- YELTON. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. J. immunol. 1995, vol.155, no.4, p.1994-2004.
- 35 • JACKSON y col. In vitro antibody maturation. Improvement of a high affinity, neutralizing antibody against IL-1 beta. J. immunol. 1995, vol.154, no.7, p.3310-9.
- HAWKINS y col. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. Journal of molecular biology. 1992, vol.226, no.3, p.889-96.
- 40 • SMITH y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, no.147, p.195-7.
- BRENNAN y col. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. Science. 1985, vol.229, no.4708, p.81-3.
- SHALABY y col. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. The Journal of experimental medicine. 1992, vol.175, no.1, p.217-25.
- 45 • KOSTELNY y col. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J. immunol. 1992, vol.148, no.5, p.1547-33.
- ZAPATA y col. Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in Escherichia coli and enhanced antiproliferative activity. Protein engineering. 1995, vol.8, no.10, p.1057-62.
- 50 • HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. • HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.118-228.
- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p. 229-285.
- FELGNER y col. Cationic liposome mediated transfection. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 1989, vol.32, p.115-21.
- 55 • HODGSON y col. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. Nature biotechnology. 1996, vol.14, no.3, p.339-42.
- REMY y col. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. Bioconjugate chemistry. 1994, vol.5, no.6, p.647-54.
- 60 • LATHE y col. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. Gene. 1987, vol.57, no.2-3, p.193-201.
- LUPTON y col. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. Molecular and cellular biology. 1985, vol.5, no.10, p.2533-42.
- YATES y col. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature. 1985, vol.313, no.6005, p.812-5.

- SUMMERS y col. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*. 1984, vol.36, no.4, p.1097-103.
- SUTTER y col. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, vol.89, no.22, p.10847-51.
- 5 • MEYER y col. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. 1991, vol.72, no.Pt5, p.1031-8.
- SUTTER y col. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. 1994, vol.12, no.11, p.1032-40.
- GRAHAM y col. *Methods in molecular biology*. Edited by MURREY. The human press inc, 1991. p.109-128.
- 10 • ZAKHARCHUK y col. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA. *Archives of virology*. 1993, vol.128, no.1-2, p.171-6.
- SPIBEY y col. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2. *The Journal of general virology*. 1989, vol.70, no.Pt 1, p.165-72.
- JOUVENNE y col. Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes. *Gene*. 1987, vol.60, no.1, p. 21-8.
- 15 • MITTAL y col. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. *The Journal of general virology*. 1995, vol.76, no.Pt 1, p.93-102.
- BISCHOFF y col. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996, vol.274, no.5286, p.373-6.
- 20 • HEISE y col. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Medicine*. 2000, vol.6, no.10, p.1134-9.
- FUEYO y col. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*. 2000, vol.19, no.1, p.2-12.
- MCIVOR. Human purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase: gene transfer into cultured cells and murine hematopoietic stem cells by using recombinant amphotropic retroviruses. *Molecular and cellular biology*. 1987, vol.7, no.2, p.838-46.
- 25 • TABIN y col. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology*. 1982, vol.2, no.4, p.426-36.
- TAKEBE y col. SR alpha promoter an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and cellular biology*. 1988, vol.8, no.1, p.466-72.
- 30 • CHEN y col. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. *The Journal of clinical investigation*. 1995, vol.96, no.6, p.2775-82.
- SCHREWE y col. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and cellular biology*. 1990, vol.10, no.6, p.2738-48.
- 35 • VILE y col. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer res.* 1993, vol.53, no.17, p.3860-4.
- HARRIS y col. Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. *Gene therapy*. 1994, vol.1, no.3, p.170-5.
- 40 • KANAI y col. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer res.* 1997, vol.57, no.3, p. 461-5.
- PEREZ. Principles and practice of radiation oncology. 2ª edición LIPPINCOTT, 1992.
- 45 • KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15(20): 8125-8148.
- CHOTHIA y LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) *J Mol Biol.* 20 de agosto de 1987; 196(4):901-17.

LISTADO DE SECUENCIAS TRANSGENE SA

- 50 <110> TRANSGENE SA
- <120> Anticuerpo contra el CSF-1R
- <130> R1411 PCT S3
- <150> EP 08 36 0005.6
- 55 <151> 14-03-2008
- <150> US 61/043.884
- <151> 10-04-2008
- 60 <160> 36
- <170> PatentIn versión 3.4

ES 2 567 298 T3

<210> 1
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 1

```

atgtacttgg gactgaacta tgtattcata gtttttctcc taaatgggtg ccagagtgaa      60
gtgaagcttg aggagtctgg aggaggcttg gtgcagcctg gaggatccat gaaactctct      120
tgtgctgcct ctggattcac ttttagtgac gcctggatgg actgggtccg ccagtctcca      180
gagatgggac ttgagtgggt tgctgaaatt agaagcaaag ctaataatca tgcaacattc      240
tatgctgagt ctgtgaaagg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtagtgtc      300
tacctgcaaa tgaacagctt aagacctgaa gacactggca tttattactg taccagggta      360
aaggtaggct ttgacaactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca      420

acagcccat  cggcttatcc actggccctt gtgtgtggag atacaactgg ctctctggtg      480
actctaggat gcctggtcaa gggttatttc cctgagccag tgacctgac ctggaactct      540
ggatccctgt ccagtgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcaagtctga cctctacacc      600
ctcagcagct cagtgactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat      660
gtggcccacc cggcaagcag caccaagggt gacaagaaaa ttgagcccag agggcccaca      720
atcaagccct gtctccatg caaatgccca gcacctaac tcttgggtgg accatccgtc      780
ttcatcttcc ctcaaagat caaggatgta ctcatgatct cctgagccc catagtcaca      840
tgtgtgggtg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac      900
aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc      960
cgggtgggtc gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa     1020
tgcaagggtc acaacaaga cctcccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa     1080
gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag     1140

aaacagggtc ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag     1200
tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct     1260
gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga     1320
aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc     1380
ttctccogga ctccgggtaa atga                                             1404
    
```

10

ES 2 567 298 T3

<210> 2
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 2

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

ES 2 567 298 T3

				180					185					190			
Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr		
		195					200					205					
Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro		
	210					215					220						
Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr		
225					230					235					240		
Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly		
				245					250					255			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met		
			260					265					270				
Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu		
		275					280					285					
Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val		
	290					295					300						
His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu		
305					310					315					320		
Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly		
				325					330					335			
Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile		
			340					345					350				
Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val		
		355					360					365					
Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr		
	370					375					380						
Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu		
385					390					395					400		
Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro		
				405					410					415			
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val		
			420					425					430				

ES 2 567 298 T3

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
 435 440 445

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

5 <210> 3
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 3

atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt	60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc	120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catgggatca gcagaaacag	180
ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca	240
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct	300
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctctcggac gttcggtgga	360
ggcaccaagt tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca	420
tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac	480
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg	540
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcagc	600
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca	660
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag	705

10
 15 <210> 4
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

ES 2 567 298 T3

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110

Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 5

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15

Val Gln Ser

10

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 6

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Met Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

20

<210> 7
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 7

ES 2 567 298 T3

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 8

5

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Arg Cys
 20

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

15

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 10

ES 2 567 298 T3

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

<210> 11
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp
 1 5

<210> 12
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 12

Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 13

Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn
 1 5

<210> 14
 <211> 6
 30 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 14

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
1 5

5

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 15

Ala Ala Thr
1

15

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 16

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr
1 5

25

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 17

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

35

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40

<400> 18

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

45

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 19

Val Lys Val Gly Phe Asp Asn
1 5

50

<210> 20

ES 2 567 298 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 20

 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 10

 <400> 21
 15

 Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5

 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20

 <400> 22

 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr
 1 5
 25

 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30

 <400> 23

 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 1 5
 35

 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40

 <400> 24

 Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala
 1 5
 45

 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50

 <400> 25

 Val Lys Val Gly Phe Asp Asn
 1 5

 <210> 26

ES 2 567 298 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 26

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

10 <210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 27

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5

20 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 28

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr
 1 5

25 <210> 29
 <211> 972
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 29

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
 1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
 20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
 35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
 50 55 60

ES 2 567 298 T3

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly
65 | 70 75 | 80

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
260 265 270

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser
290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn
305 310 315 320

ES 2 567 298 T3

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp
 325 330 335

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala
 340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu
 355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg
 370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr
 385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr
 405 410 415

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
 420 425 430

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
 435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
 450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
 465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
 485 490 495

Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
 500 505 510

Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
 515 520 525

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
 530 535 540

Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
 545 550 555 560

Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu

ES 2 567 298 T3

				565						570					575			
Phe	Pro	Arg	Asn	Asn	Leu	Gln	Phe	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala			
			580					585					590					
Phe	Gly	Lys	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Lys	Glu	Asp			
		595					600					605						
Ala	Val	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Ser	Thr	Ala	His	Ala			
	610					615					620							
Asp	Glu	Lys	Glu	Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Leu	Lys	Ile	Met	Ser	His	Leu			
625					630					635					640			
Gly	Gln	His	Glu	Asn	Ile	Val	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	His	Gly			
				645					650					655				
Gly	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Thr	Glu	Tyr	Cys	Cys	Tyr	Gly	Asp	Leu	Leu			
			660					665					670					
Asn	Phe	Leu	Arg	Arg	Lys	Ala	Glu	Ala	Met	Leu	Gly	Pro	Ser	Leu	Ser			
		675					680					685						
Pro	Gly	Gln	Asp	Pro	Glu	Gly	Gly	Val	Asp	Tyr	Lys	Asn	Ile	His	Leu			
	690					695					700							
Glu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg	Arg	Asp	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Gln	Gly	Val			
705					710					715					720			
Asp	Thr	Tyr	Val	Glu	Met	Arg	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Ser	Asn	Asp	Ser			
				725					730					735				
Phe	Ser	Glu	Gln	Asp	Leu	Asp	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu			
			740					745					750					
Arg	Asp	Leu	Leu	His	Phe	Ser	Ser	Gln	Val	Ala	Gln	Gly	Met	Ala	Phe			
		755					760						765					
Leu	Ala	Ser	Lys	Asn	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Val	Ala	Ala	Arg	Asn	Val			
	770					775					780							
Leu	Leu	Thr	Asn	Gly	His	Val	Ala	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala			
785					790					795					800			
Arg	Asp	Ile	Met	Asn	Asp	Ser	Asn	Tyr	Ile	Val	Lys	Gly	Asn	Ala	Arg			
				805					810					815				

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
 820 825 830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
 835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
 850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
 865 870 875 880

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
 885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
 900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
 915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
 930 935 940

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
 945 950 955 960

Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
 965 970

5 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador OTG18929"

<400> 1
 gccgccacca tgtactggg actgaactat gtattc 36

15 <210> 31
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador OTG18930"

25 <400> 1
 ggagatcttc atttaccgg agtccggga 29

ES 2 567 298 T3

<210> 32
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador OTG18931"
 10
 <400> 1
 gccgccacca tgagtggtgcc cactcaggt cctg 34
 <210> 33
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador OTG18932"
 20
 <400> 1
 gcccggtcta acactcattc ctgttgaag ctc 33
 25
 <210> 34
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: plásmido pTG17895"
 35
 <400> 1
 atgagcgtgc ccaccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60
 gacatccaga tgaccagag ccccgccagc ctgagcgtga gcgtgggcca gaccgtgacc 120
 atcacctgca gggccagcga gaacatctac agcaacctgg cctgggatca gcagaagcag 180
 ggcaagagcc cccagctgct ggtgcacgct gccaccaacc tggccgacgg cgtgccctcc 240
 aggttcagcg gcagcggctc cggcaccag tacagcctga agatcaacag cctgcagagc 300
 gaggacttcg gcagctacta ctgccagcac ttctggggca cccaaggac cttcggcgge 360
 ggcaccaagc tggagatcaa gaggaccgtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 420
 agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 480
 ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaacgcc tgcaagcgg caacagccag 540
 gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggc tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 600
 ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660
 ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggagcgt gttga 705
 40
 <210> 35
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <221> Fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: plásmido pTG17868"
 45
 <400> 1
 atgtacctgg gcctgaacta cgtgttcatc gtgtttctgc tgaacggcgt gcagagcgag 60
 gtgaagctgg aggaaagcgg cggagggctg gtgcagccag gcgggagcat gaaactgtcc 120
 tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcgcg gcctggatgg actgggtgcg ccagagcccc 180
 gagatgggccc tggagtgggt ggccgagatc aggtccaagg ccaacaacca cgccaccttc 240
 tacgccgaga gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acgacagcaa gagcagcgtg 300

ES 2 567 298 T3

tacctgcaga	tgaacagcct	gaggcccgag	gacaccggca	tctactactg	caccagagtg	360
aaagtgggct	tcgacaactg	gggcccaggg	accacactga	ccgtgtccag	cgccagcacc	420
aagggcccca	gcgtgttccc	cctggccccc	agctccaaga	gcaccagcgg	aggaacagct	480
gctctgggct	gcctggtgaa	ggactacttc	cccagaccgg	tgaccgtgtc	ttggaacagc	540
ggagccctga	cctccggcgt	gcacaccttc	cccgcctgtc	tgacagagcag	cggcctgtac	600
agcctgagca	gcgtggtgac	agtgccagc	agcagcctgg	gcaccagac	ctacatctgc	660
aacgtgaacc	acaagccag	caacaccaag	gtggacaaga	aggtggagcc	caagagctgc	720
gacaagacc	acacctgtcc	tccctgccc	gcccagagc	tgctgggagg	accctccgtg	780
ttcctgttcc	cccccaagcc	caaggacacc	ctgatgatca	gcaggacccc	cgaggtgacc	840
tgcggtgggg	tggacgtgtc	ccacgaggac	ccagaggtga	agttcaactg	gtacgtggac	900
ggcggtgggg	tgacaacgc	caagaccaag	cccagagagg	aacagtacaa	cagcacctac	960
agggtgggtg	ccgtgctgac	cgtgctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggaatacaag	1020
tgcaaggtct	ccaacaaggc	cctgccagcc	cccacgaaa	agaccatcag	caaggccaag	1080
ggccagccac	gggagcccca	ggtgtacacc	ctgccccct	cccgggacga	gctgaccaag	1140
aaccaggtgt	ccctgacctg	tctggtgaag	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	1200
tgggagagca	acggccagcc	cgagaacaac	tacaagacca	ccccccagt	gctggacagc	1260
gacggcagct	tcttctgtg	cagcaagctg	accgtggaca	agagcaggtg	gcagcagggc	1320
aacgtgttca	gatgcagcgt	gatgcacgag	gcctgtcaca	accactacac	ccagaagagc	1380
ctgagcctgt	ccccggcaa	gtga				1404

<210> 36
 <211> 1395
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: plásmido pTG17869"

10

<400> 1

atgtacctgg	gcctgaacta	cgtgttcac	gtgtttctgc	tgaacggcgt	gcagagcgag	60
gtgaagctgg	aggaagcgg	cggagggctg	gtgcagcctg	gaggaagcat	gaagctgtcc	120
tgcgctgcc	cgggcttcac	cttcagcgac	gcctggatgg	actgggtgcg	ccagagcccc	180
gagatgggcc	tggagtgggt	ggccgagatc	aggtccaagg	ccaacaacca	cgccaccttc	240
tacgcccaga	gcgtgaagg	caggttcacc	atcagcaggg	acgacagcaa	gagcagcgtg	300
tacctgcaga	tgaacagcct	gaggcccgag	gacaccggca	tctactactg	caccagagtg	360
aaagtgggct	tcgacaactg	gggcccaggg	accacactga	ccgtgtccag	cgccagcacc	420
aagggcccca	gcgtgttccc	cctggccccc	tgacagagaa	gcaccagcga	gagcacagcc	480
gccctgggct	gcctggtgaa	ggactacttc	cccagaccgg	tgaccgtgtc	ttggaacagc	540
ggagccctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	cccgcctgtc	tgacagagcag	cggcctgtac	600
agcctgagca	gcgtggtgac	cgtgcccagc	agcagcctgg	gcaccaagac	ctacacctgc	660
aacgtggacc	acaagccag	caacaccaag	gtggacaaga	gggtggagag	caagtacggc	720
ccacctgccc	cctcttggcc	agcccccgag	ttcctggggc	gacctagcgt	gttctctgttc	780
cccccaagc	ccaaggacac	cctgatgatc	agcaggaccc	ccgaggtgac	ctgcgtgggtg	840
gtggacgtgt	cccaggaaga	tccagaggtc	cagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	900
gtgcacaacg	ccaagaccaa	gcccagagag	gaacagttta	acagcaccta	caggggtggtg	960
tccgtgctga	ccgtgctgca	ccaggactgg	ctgaacggca	aggaatacaa	gtgcaaggtc	1020
tccaacaagg	gcctgccag	ctccatcgaa	aagacctca	gcaaggccaa	gggcccagcca	1080
ggggagcccc	agggtgtac	cctgccaccc	agccaagagg	aatgaccaa	gaaccaggtg	1140
ttcctgacct	gtctggtgaa	gggcttctac	cccagcgaca	tcgcccgtgga	gtgggagagc	1200
aacggccagc	ccgagaacaa	ctacaagacc	acccccccag	tgctggacag	cgacggcagc	1260
ttcttctgt	acagcaggct	gaccgtggac	aagtccaggt	ggcaggaagg	caacgtcttt	1320
agctgcagcg	tgatgcacga	ggccctgcac	aaccactaca	cccagaagag	cctgagcctg	1380
ttcctgggca	agtga					1395

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente al CSF-1R humano, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable que comprende las tres CDR expuestas en las SEQ ID NO: 11, 12 y 13 y una región variable que comprende las tres CDR expuestas en las SEQ ID NO: 14, 15 y 16.
- 5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable comprende una, más preferentemente dos, incluso más preferentemente tres y de manera definitiva preferentemente cuatro FR humanas.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable que comprende las tres CDR expuestas en las SEQ ID NO: 11, 12 y 13 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6.
- 10 4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable que comprende las tres CDR expuestas en las SEQ ID NO: 14, 15 y 16 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 9.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y una región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9.
- 15 6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que dicha región variable de cadena pesada comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos K3Q, E5V, M18L y P90A.
7. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que dicha región variable de cadena pesada comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos K3Q, E5V, M18L, K19R, S40A, E42G, M43K, R89K, P90T, I95V, T113L y L114V.
8. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que dicha región variable de cadena ligera comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: A9S, E17D, T18R, Q40P, S43A, Q45K, A55E, D56S, Q70D, S72T, K74T, N76S, S80P, S85T y G100Q.
- 20 9. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que dicha región variable de cadena ligera comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos A9S, V13A, E17D, T18R, Q40P, K74T, N76S y S80P.
10. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que dicha región variable de cadena ligera comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos A9S, V13A, E17D, T18R, Q40P, S43A, Q45K, V48L, D56S, Q70D, S72T, K74T, N76S, S80P, G84A, S85T y G100Q.
- 25 11. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que comprende un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un Fab, un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un fragmento de anticuerpo, un diacuerpo y un Fd.
12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 30 13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión de al menos 10⁹M⁻¹.
14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho anticuerpo está conjugado con un agente radiosensibilizador, un receptor y/o un agente citotóxico.
15. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 35 16. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 15.
17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 15 o el vector de la reivindicación 16 y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 40 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que dicha composición comprende adicionalmente un compuesto de interés.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18, en la que dicho compuesto de interés es un compuesto terapéutico y preferentemente un agente terapéutico para el cáncer o un compuesto útil en el tratamiento de disminución de masa ósea.
- 45 20. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de la reivindicación 16, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con una actividad aumentada de osteoclastos.
21. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de la reivindicación 16, la composición farmacéutica de una cualquiera de las

reivindicaciones 17 a 19 para su uso en el tratamiento del cáncer.

5 22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de la reivindicación 16, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 para su uso en la prevención o el tratamiento de un cáncer metastásico óseo en un paciente que padece un cáncer metastásico.

23. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de la reivindicación 16, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria intestinal.

10 24. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de la reivindicación 16, la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 para su uso en el tratamiento de un paciente que padece artritis reumatoide.

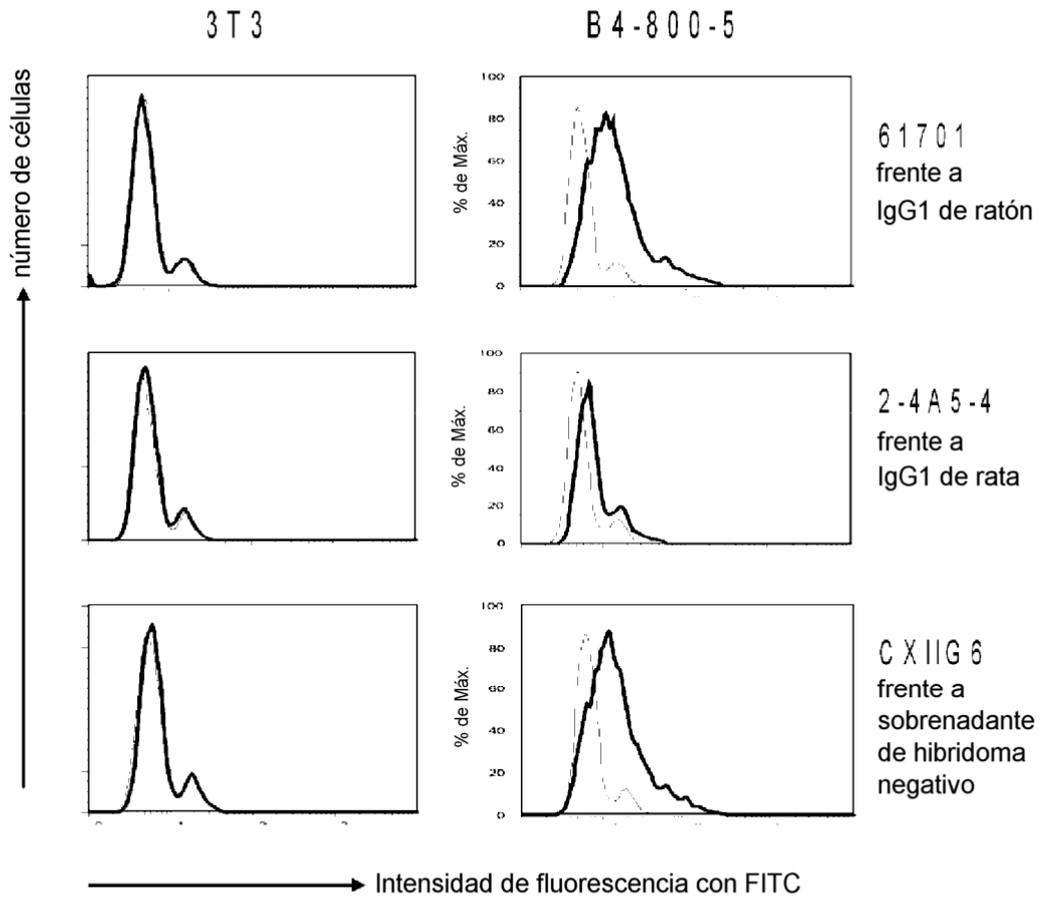


Fig. 1

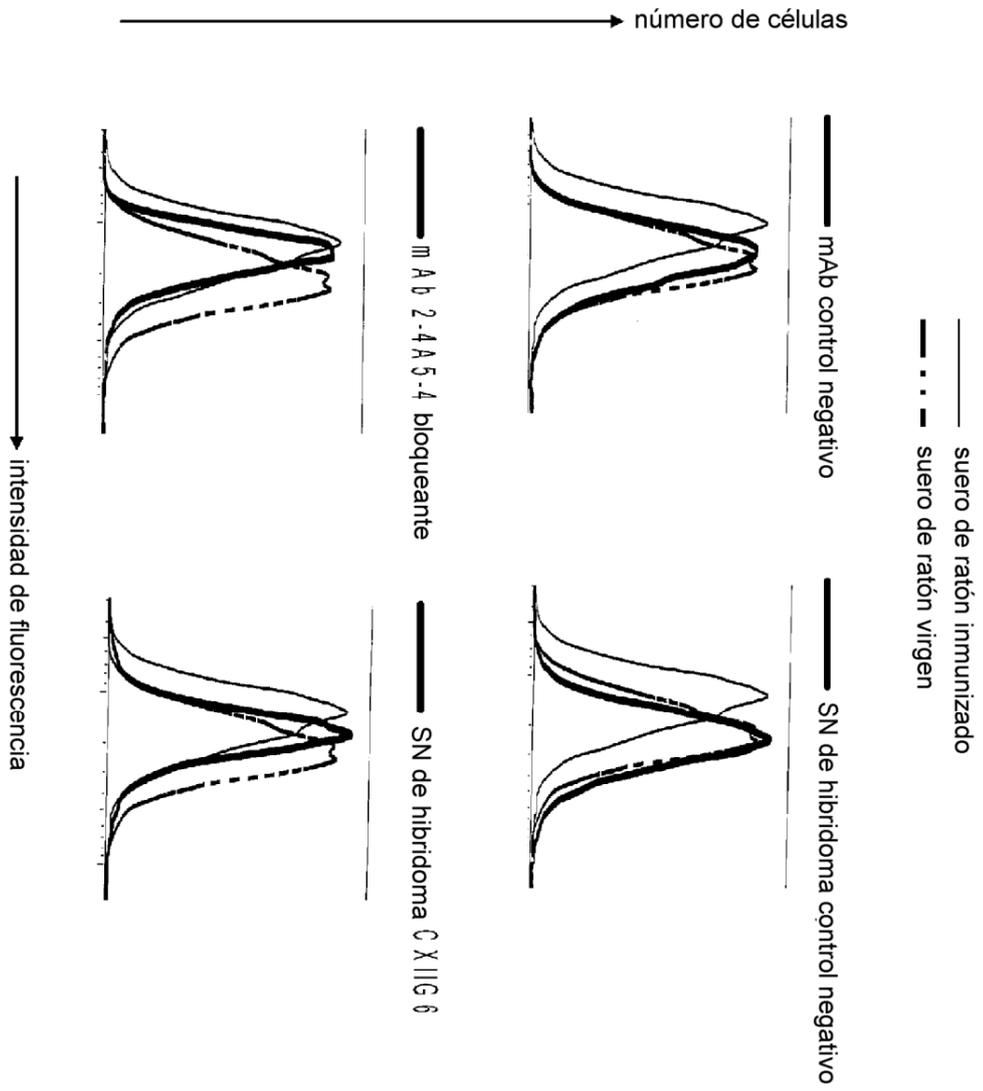


Fig. 2

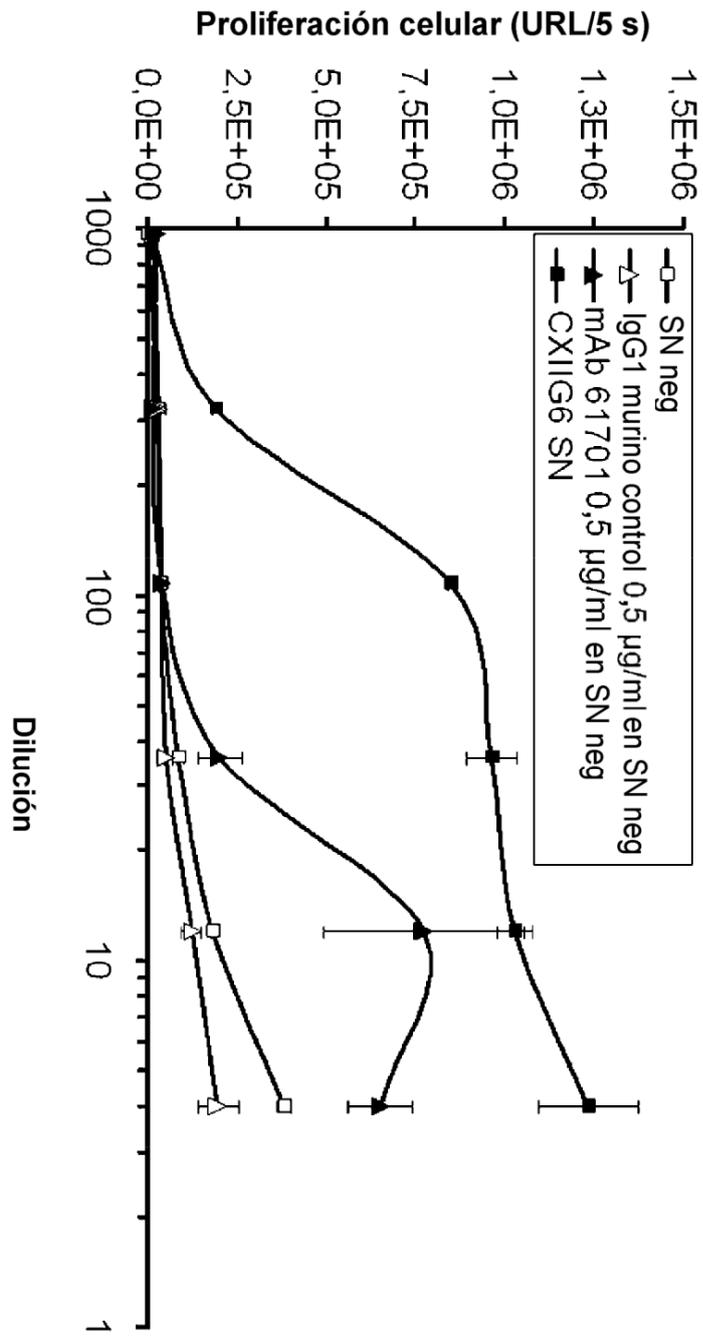


Fig. 3

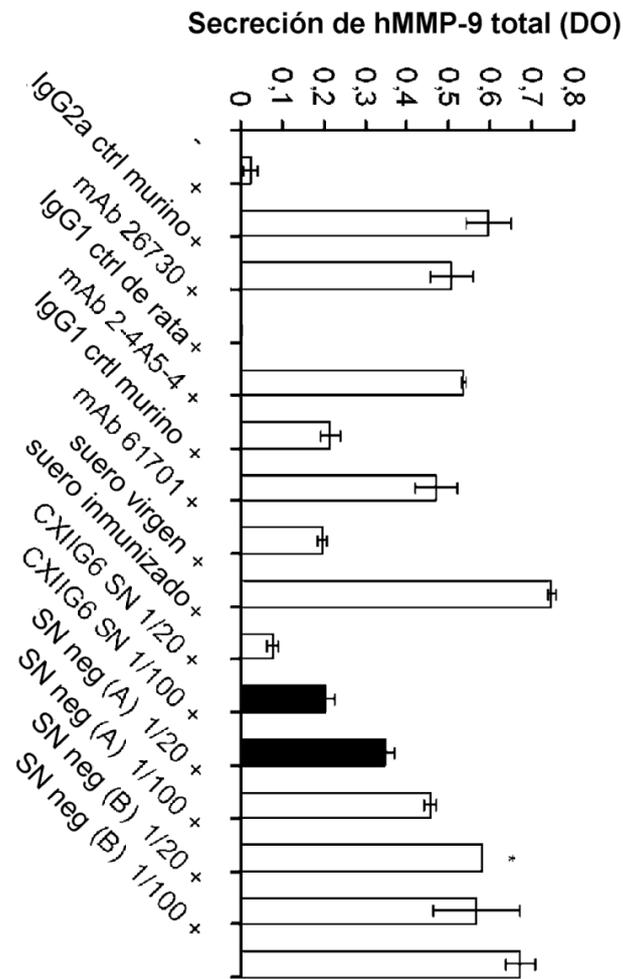


Fig. 4

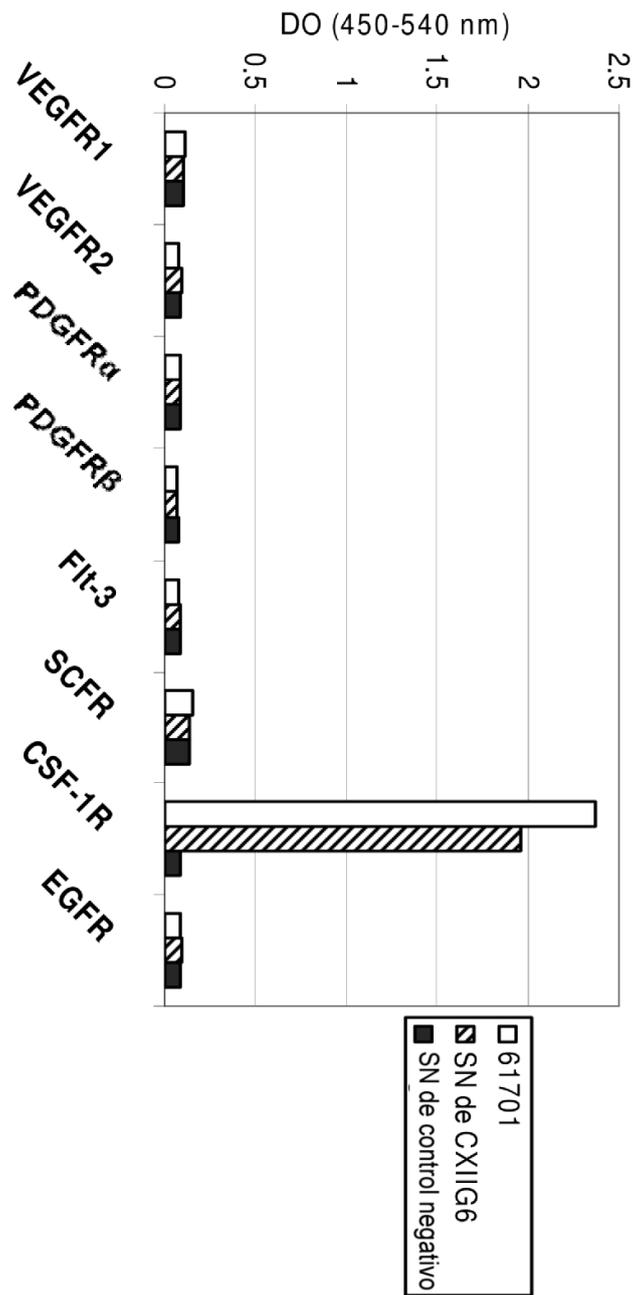


Fig. 5

ES 2 567 298 T3

SfiI
GGCCAGCCGGCCAGTGACAGACACAGACATAGAACATTCCAGATGTACTTGGGACTGA 60
M Y L G L N
ACTATGTATTTCATAGTTTTTCTCCTAAATGGTGTCCAGAGTGAAGTGAAGCTTGAGGACT 120
Y V F I V F L L N G V Q S **E V K L E E S**
CTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGAT 180
G G G L V Q P G G S M K L S C A A S G F
TCACTTTTGTAGTGACGCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGATGGGACTTGAGT 240
T F S D A W M D W V R Q S P E M G L E W
GGGTTGCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAATCATGCAACATTCTATGCTGAGTCTGTGA 300
V A E I R S K A N N H A T F Y A E S V K
AAGGAGGTTACCATCTCAAGAGATGATCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACA 360
G R F T I S R D D S K S S V Y L Q M N S
GCTTAAGACCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACCAGGGTAAAGGTAGGCTTTGACA 420
L R P E D T G I Y Y C T R V K V G F D N
ACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCT 480
W G Q G T T L T V S S A K T T A P S V Y
ATCCACTGGCCCCGTGTGTGGAGATACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGG 540
P L A P V C G D T T G S S V T L G C L V
TCAAGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGT 600
K G Y F P E P V T L T W N S G S L S S G
GTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGTCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGA 660
V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T

XhoI
CTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAA 720
V T S S T W P S Q S I T C N V A H P A S
GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTC 780
S T K V D K K I E P R G P T I K P C P P
CATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCAA 840
C K C P A P N L L G G P S V F I F P P K
AGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATG 900
I K D V L M I S L S P I V T C V V V D V
TGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACA 960
S E D D P D V Q I S W F V N N V E V H T
CAGCTCAGACACAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCACTGCC 1020
A Q T Q T H R E D Y N S T L R V V S A L
TCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA 1080
P I Q H Q D W M S G K E F K C K V N N K
AAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTC 1140
D L P A P I E R T I S K P K G S V R A P
CACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAAACAGGTCACTCTGA 1200
Q V Y V L P P P E E E M T K K Q V T L T
CCTGCATGGTACAGACTTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGA 1260
C M V T D F M P E D I Y V E W T N N G K
AAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCA 1320
T E L N Y K N T E P V L D S D G S Y F M
TGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTT 1380
Y S K L R V E K K N W V E R N S Y S C S
CAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGG 1440
V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G

NotI
GTAAATGAGCTCAGCACCCACAAAACCTCTCAGGTCCAAAGAGACACCCACGCGGCCGC 1498
K *

Fig. 6

ES 2 567 298 T3

SfiI
GGCCAGCCGGCCGGAGTCAGCCTCACACTGATCACACACAGACATGAGTGTGCCCACTC 60
M S V P T Q

AGGTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACTC 120
V L G L L L L W L T D A R C D I Q M T Q

AGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAA 180
S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S

GTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGC 240
E N I Y S N L A W Y Q Q K Q G K S P Q L

TCCTGGTCCATGCTGCAACAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG 300
L V H A A T N L A D G V P S R F S G S G

GATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGAGTT 360
S G T Q Y S L K I N S L Q S E D F G S Y

ATTACTGTCAACATTTTTGGGGTACTCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGTTGGAAA 420
Y C Q H F W G T P R T F G G G T K L E I

TCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAA 480
K R A D A A P T V S I F P P S S E Q L T

CATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATG 540
S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V

TCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCCTGAACAGTTGGACTGATC 600
K W K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q

AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGT 660
D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y

ATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTCACCCATTG 720
E R H N S Y T C E A T H K T S T S P I V

TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACCACCAGCT 788
K S F N R N E C *

NotI
GCGGCCGC 788

Fig. 7

pTG17753

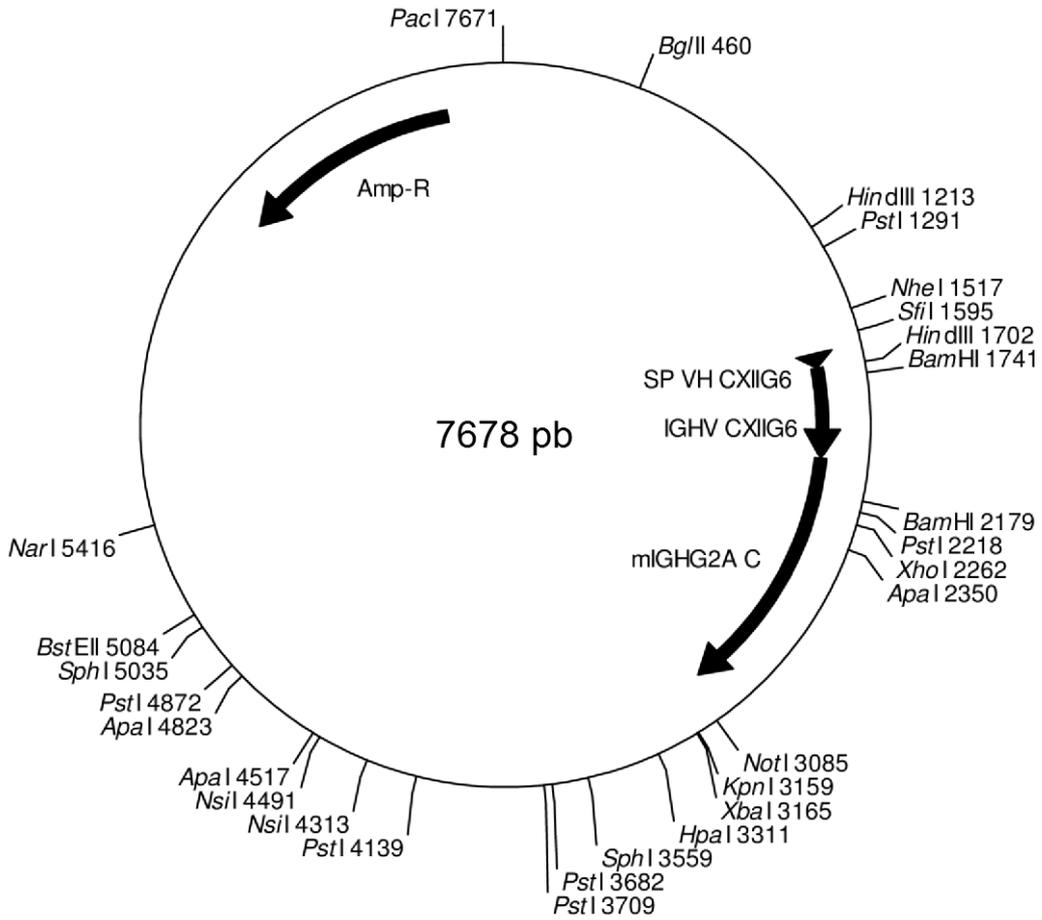


Fig. 8

pTG17727

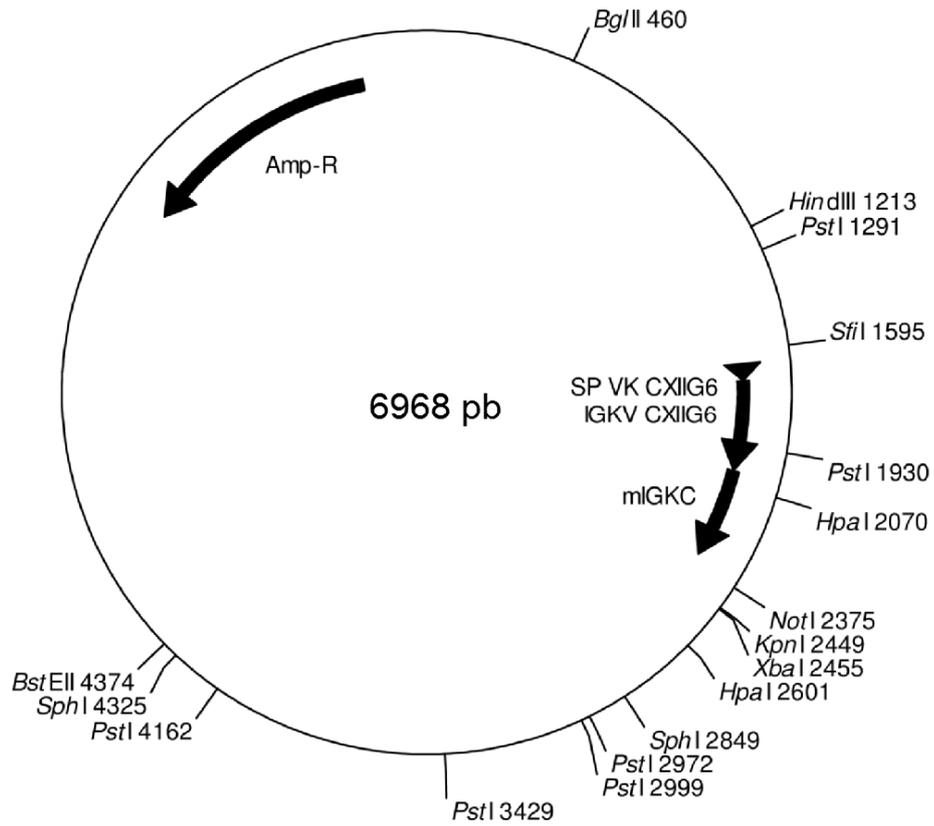


Fig. 9

pOptiVEC™

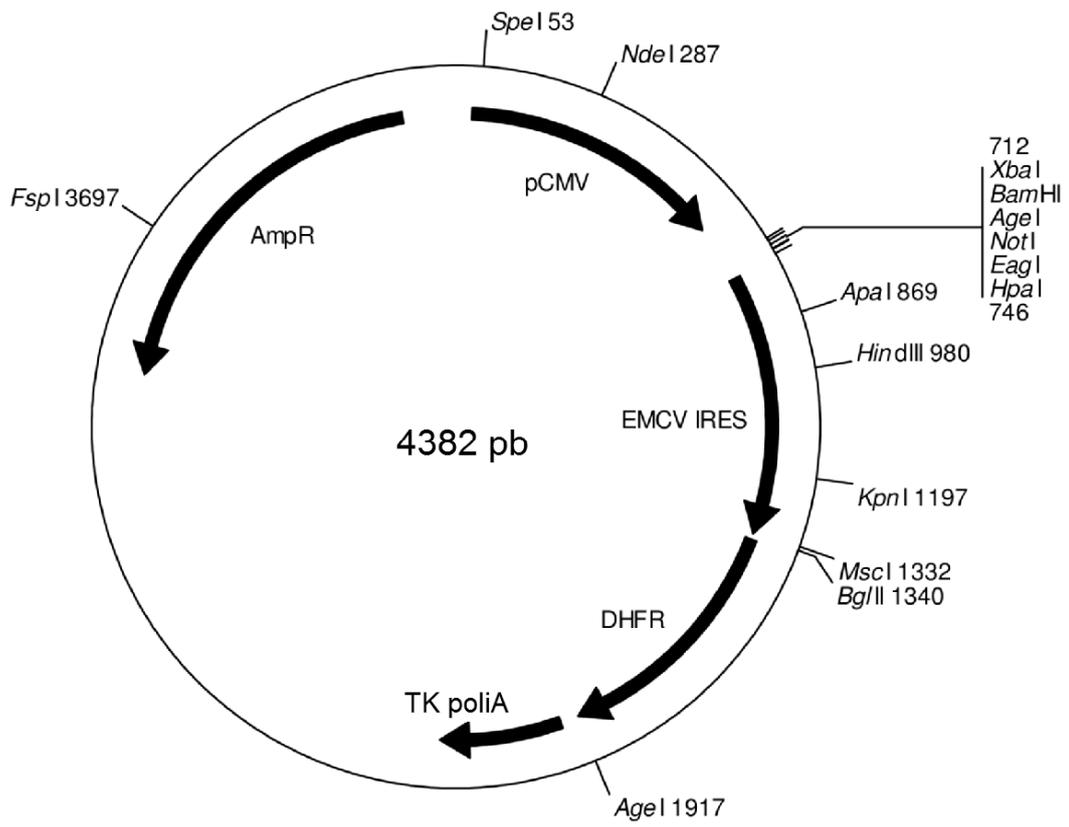


Fig. 10

pTG17895

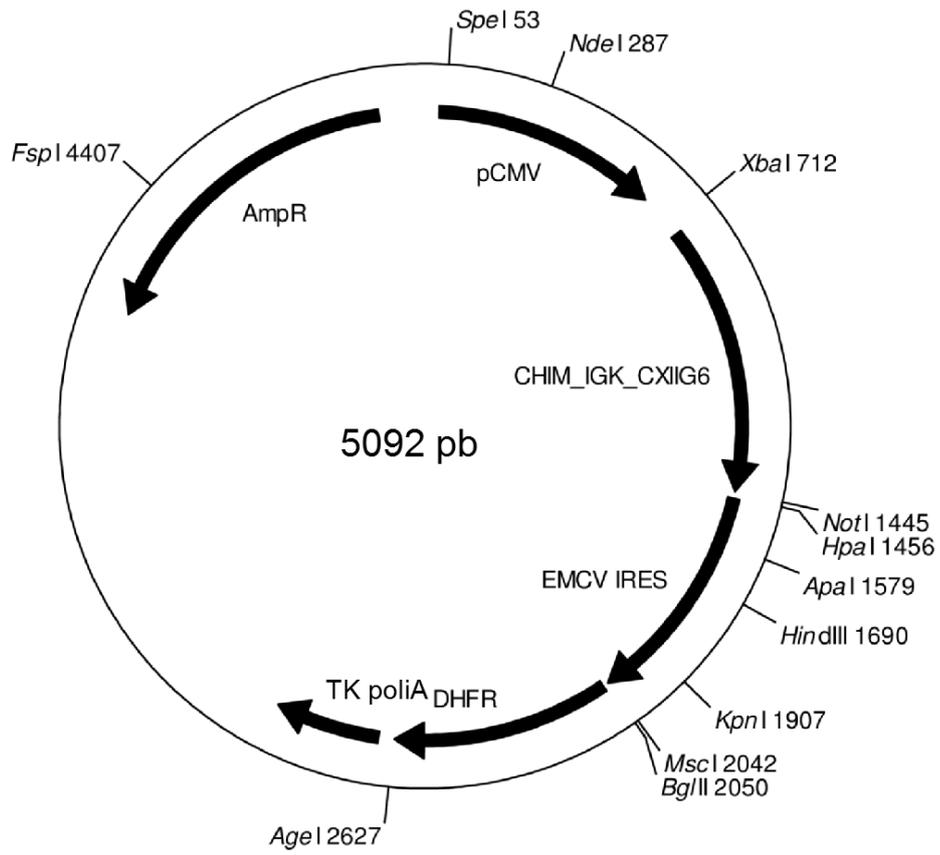


Fig. 11

pTG17812

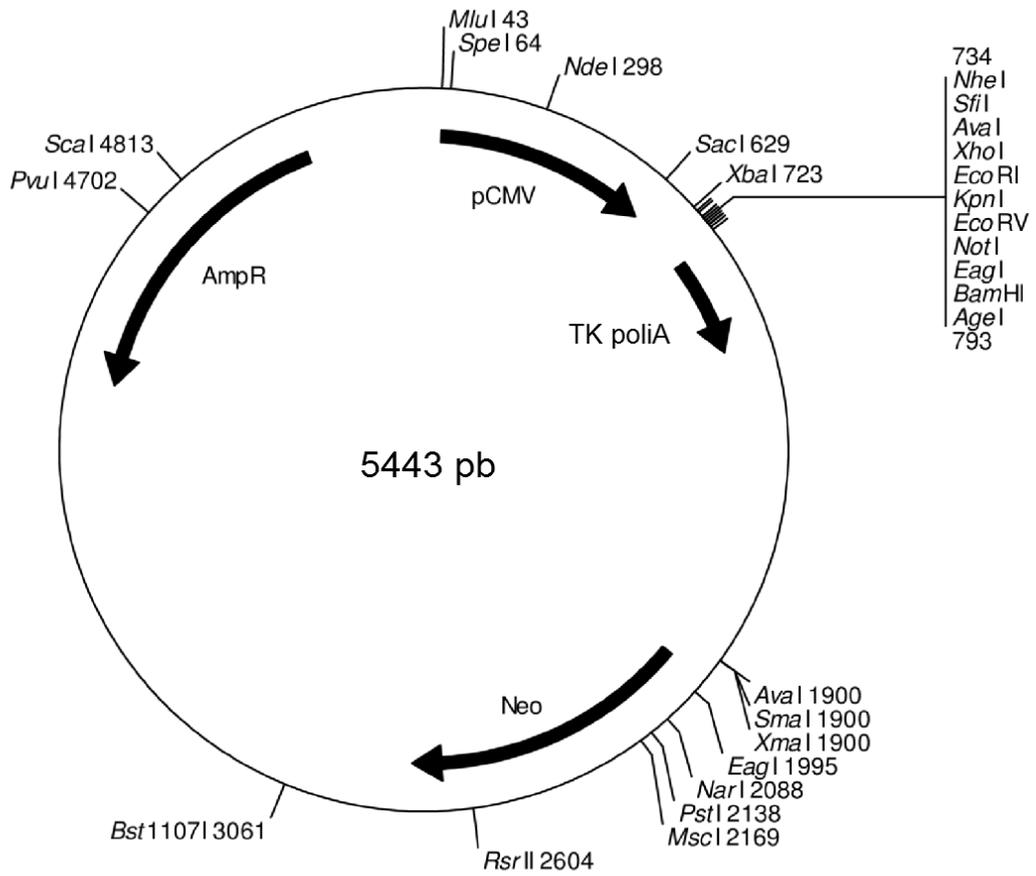


Fig. 12

pTG17868

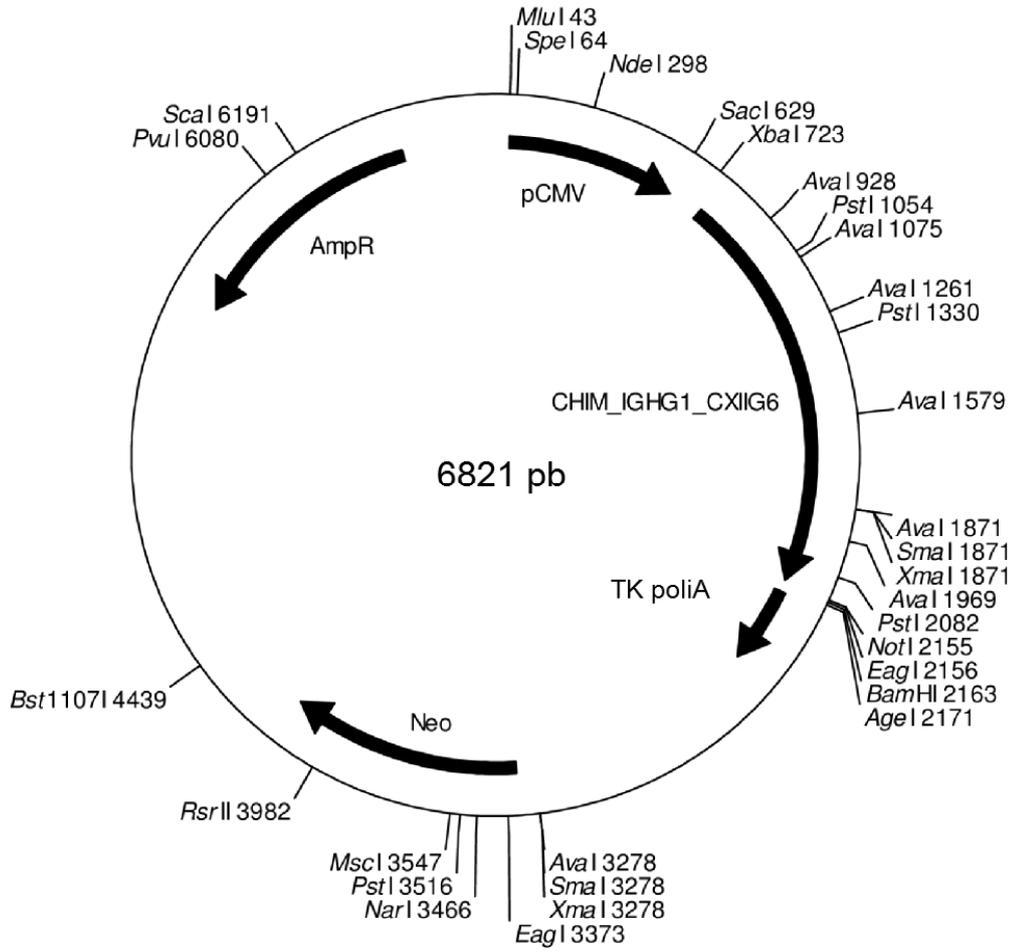


Fig. 13

pTG17869

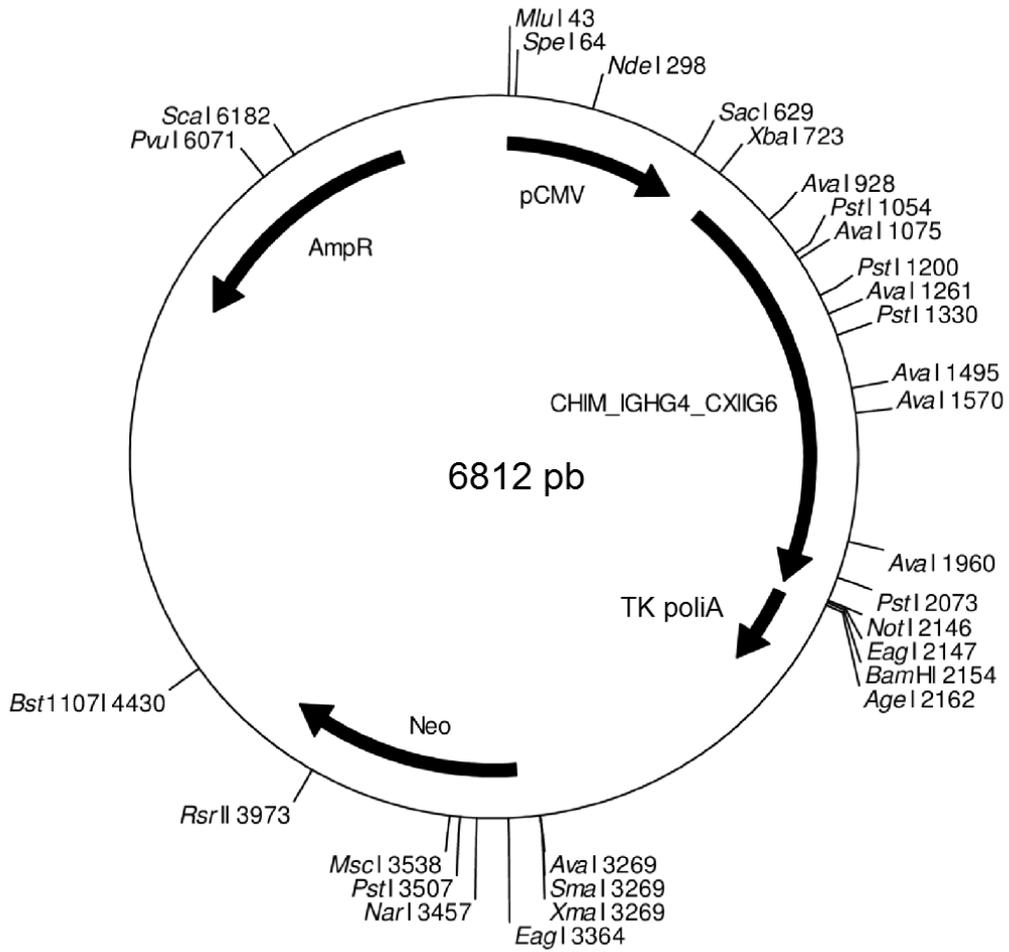


Fig. 14

		Aminoácidos* sustituidos en VL CXIII66																			
K1	PTG17896	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K2	PTG17897	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K3	PTG17899	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K4	PTG17900	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K		H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P		S85T	G100Q
K5	PTG17901	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K				A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P		S85T	G100Q
K6	PTG17902	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K				A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K7	PTG17903	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K				A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K8	PTG17904			E17D									D56S	Q70D			N76S				G100Q
K9	PTG17905	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K10	PTG17906	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K					D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P		S85T	G100Q
K11	PTG17907	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K					D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K12	PTG17947	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40D							D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P			G100Q
K13	PTG17948	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K14	PTG17949	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P							D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P			G100Q
K15	PTG17950	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q

*Los aminoácidos en negrita tienen una accesibilidad relativa al disolvente en la cadena lateral por encima del 50 % y los subrayados por debajo del 25 %

Fig. 15

		Aminoácidos ^a sustituidos en VH CXIIIIG6																			
H1	PTG17870	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	TI13L	L114V	
H2	PTG17871	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	TI13L	L114V	
H3	PTG17872	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	TI13L	L114V	
H4	PTG17873	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	TI13L	L114V	
H5	PTG17874	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	TI13L	L114V	
H6	PTG17875	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	TI13L	L114V	
H7	PTG17883	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N		R89K			I95V	TI13L	L114V	
H8	PTG17884	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N		R89K			I95V	TI13L	L114V	
H9	PTG17885	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N		R89K			I95V	TI13L	L114V	
H10	PTG17886	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				TI13L	L114V	
H11	PTG17887	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				TI13L	L114V	
H12	PTG17888	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				TI13L	L114V	
H13	PTG17889				K19R										R89K				TI13L	L114V	
H14	PTG17890				K19R										R89K				TI13L	L114V	
H15	PTG17891				K19R										R89K				TI13L	L114V	
H16	PTG17892	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	TI13L	L114V	
H17	PTG17893	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	TI13L	L114V	
H18	PTG17894	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	TI13L	L114V	
H19	PTG17943	K3Q	ESV	M18L	K19R										P90A					L114V	
H20	PTG17944	K3Q	ESV	M18L	K19R							E64A			R89K				TI13L	L114V	
H21	PTG17945	K3Q	ESV	M18L	K19R							E64A			R89K				TI13L	L114V	
H22	PTG17946	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K				E64A			R89K			I95V	TI13L	L114V	
H23	PTG17968	K3Q	ESV	M18L	K19R										R89K				TI13L	L114V	
H24	PTG17969	K3Q	ESV	M18L	K19R										R89K				TI13L	L114V	
H25	PTG17970	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K			I95V	TI13L	L114V	
H26	PTG17985	K3Q	ESV	M18L	K19R										R89K				TI13L	L114V	
H27	PTG17986	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K			I95V	TI13L	L114V	

^aLos aminoácidos en negrita tienen una accesibilidad relativa al disolvente en la cadena lateral por encima del 50 % y los subrayados por debajo del 25 %

Fig. 16

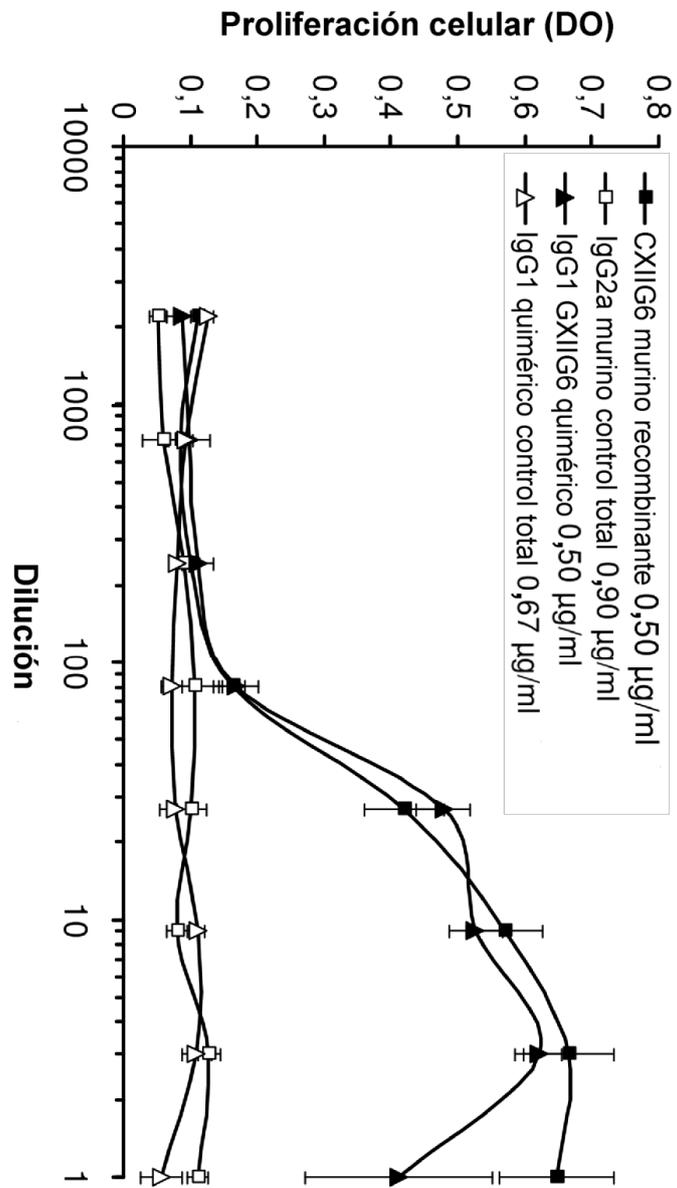


Fig. 17

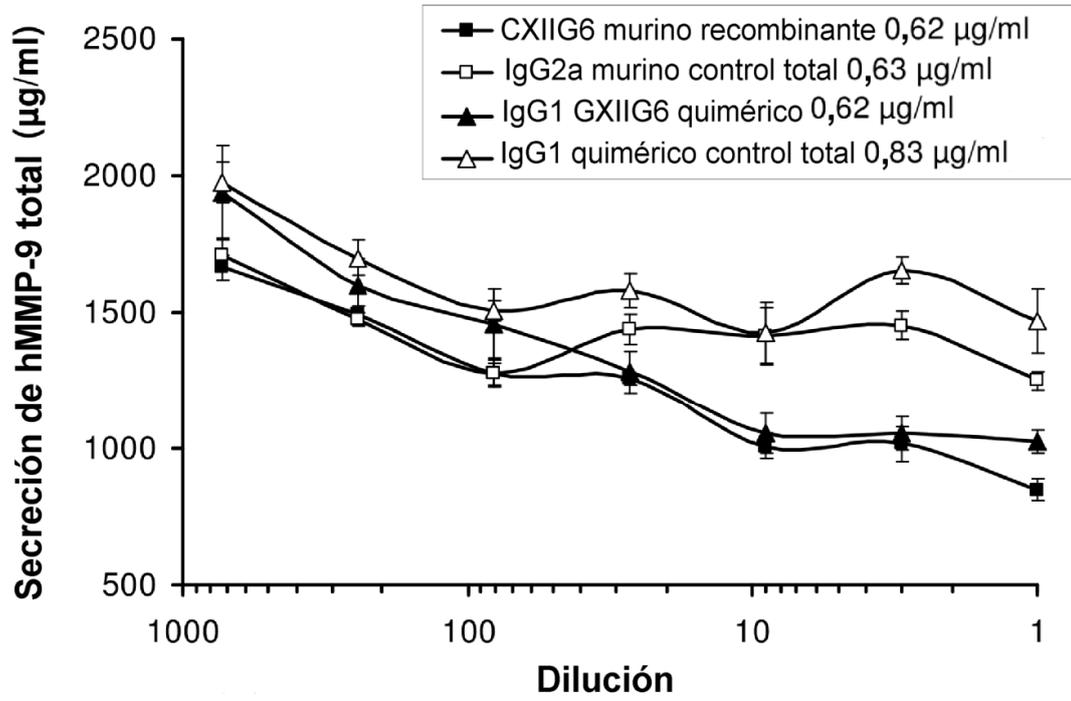


Fig. 18