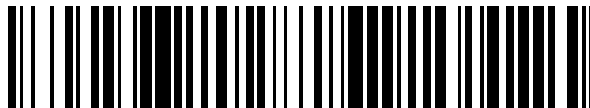


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 088**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2007 PCT/US2007/061874**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2007 WO07092939**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007 E 07763514 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 1981909**

54 Título: **Péptidos GM-CSF antigénicos y anticuerpos anti-GM-CSF**

30 Prioridad:

08.02.2006 US 771251 P
17.02.2006 US 774500 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2017

73 Titular/es:

MORPHOTEK, INC. (100.0%)
210 WELSH POOL ROAD
EXTON, PA 19341, US

72 Inventor/es:

SASS, PHILIP M.;
NICOLAIDES, NICHOLAS C.;
GRASSO, LUIGI;
LI, JIAN;
CHAO, QIMIN;
ROUTHIER, ERIC y
EBEL, WOLFGANG

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 609 088 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

Péptidos GM-CSF antigénicos y anticuerpos anti-GM-CSF

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10

[0002] La presente invención se encuadra, de forma general, en el campo de la inmunoterapéutica. Más concretamente, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales que pueden neutralizar las células autoinmunes y las células cancerosas, y que pueden neutralizar la respuesta inflamatoria.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

[0003] A lo largo de la presente especificación se citan diversas publicaciones, entre las que figuran patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos.

20

[0004] Actualmente hay varios antígenos, asociados a enfermedades, para los que se están intentando usar anticuerpos monoclonales (MAbs, por sus siglas en inglés) terapéuticos que tengan como diana dichos antígenos, dadas las singulares características farmacológicas y de seguridad de los MAbs. Entre los antígenos diana asociados a enfermedades están el CD20, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés), los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés).

25

30

35

40

[0005] Originalmente, el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) se descubrió como una proteína que tenía capacidad para generar tanto colonias de granulocitos como colonias de monocitos (macrófagos inmaduros), a partir de células precursoras, en la médula ósea de ratón, y por ello, recibió ese nombre (Burgess *et al.* (1980) Blood 56:947-58.). En estudios posteriores se ha demostrado que el GM-CSF desempeña una función en la potenciación de la función de los granulocitos y macrófagos maduros (Handman y Burgess (1979) J. Immunol. 122:1134-1137; Hamilton *et al.* (1980) J. Cell Physiol. 103:435-445; Gamble *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8667-8671), de lo que se desprende que es posible que el GM-CSF desempeñe una función en las respuestas inflamatorias (Hamilton *et al.* (1980) J. Cell Physiol. 103:435-445). A medida que se fue estudiando la molécula, fue quedando claro que el GM-CSF desempeña otras funciones que se derivan de su capacidad para afectar a las propiedades de células mieloides más maduras, como los granulocitos, los macrófagos y los eosinófilos. Las funciones del GM-CSF son mediadas por su unión al CD116, el receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos, también conocido como receptor alfa del factor estimulador de colonias 2, que se une al GM-CSF con una afinidad baja. La subunidad beta, denominada CD131, que es compartida, además, con los receptores de la IL3 (interleucina-3) y de la IL5 (interleucina-5), no tiene actividad de unión, que sea detectable, por el GM-CSF, pero, en sí, es necesaria para la unión de afinidad alta cuando actúa en asociación con la subunidad alfa, y desempeña una función fundamental en la transducción de señales. Se encuentran receptores del GM-CSF en las células progenitoras de las células mieloides y en las células mieloides maduras, como los neutrófilos, los eosinófilos, los fagocitos mononucleares y los monocitos. Además, se ha demostrado que las subunidades de los receptores del GM-CSF están presentes en tejidos no hematopoyéticos normales humanos, como la placenta, el endotelio y los oligodendrocitos del sistema nervioso central.

45

50

55

60

[0006] El GM-CSF desempeña una importante función biológica en la generación de granulocitos y macrófagos, a partir de las células progenitoras tempranas de médula ósea, presentes dentro de la médula ósea. Al principio no se advirtió, aunque luego se descubrió, que el GM-CSF desempeña funciones fisiológicas adicionales en las respuestas del "host" (hospedador) frente a los estímulos externos, así como en los estados inflamatorios y autoinmunes. En estudios muy tempranos, se purificó GM-CSF a partir de medio acondicionado por tejido pulmonar, tras inyección de lipopolisacárido (LPS) en ratones (Burgess *et al.* (1977) J. Biol. Chem. 252:1998-2003). Muchos investigadores consideran que el GM-CSF es uno de los principales reguladores del número y del estado de activación de las células del linaje de los granulocitos, macrófagos y eosinófilos, en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, también se ha formulado la hipótesis de que una expresión aberrante de GM-CSF puede tener como resultado respuestas inmunitarias e inflamatorias alteradas que tienen consecuencias patológicas. Se sugirió, hace varios años, que debería considerarse que el GM-CSF es una citoquina proinflamatoria (Hamilton *et al.*, 1980, J. Cell Physiol. 103:435-445). Además, es posible que el GM-CSF desempeñe una función en la diátesis de multitud de patologías inflamatorias humanas, como la artritis reumatoide, las patologías autoinmunes, las enfermedades inflamatorias renales y los trastornos inflamatorios pulmonares tales como el asma y la neumopatía obstructiva crónica (también denominada enfermedad pulmonar obstructiva crónica [EPOC]). Un hecho interesante es que se ha propuesto la existencia de un vínculo entre la esclerosis múltiple y el GM-CSF (McQualter *et al.* (2001) J. Exp. Med., 194:873-881). En un modelo experimental de la encefalomiелitis autoinmune, que es un modelo para la esclerosis múltiple, se descubrió que el GM-CSF está implicado en la desmielinización mediada por autoinmunidad.

65

[0007] En estudios realizados *in vivo* se ha demostrado que después de tratar monocitos, macrófagos y neutrófilos con el GM-CSF, el GM-CSF puede activar dichos tipos de células y prolongar sus características de supervivencia. Además, la exposición al GM-CSF tiene como consecuencia la liberación de mediadores de la

inflamación por parte de dichos tipos de células; en estudios adicionales se ha demostrado que dichas células tienen la capacidad de destruir ciertos organismos e, incluso, la capacidad de destruir células tumorales (Hamilton (1993) *Immunol. Today* 14:18-24; Hamilton, (1993) *Lancet* 342:536-539; Takahashi, (1993) *Blood* 81:357-364). A fin de determinar si los estudios realizados *in vivo* son indicativos de la función del GM-CSF *in vivo*, se efectuó una administración sistémica en roedores. Se demostró que al incrementar artificialmente los niveles circulantes de GM-CSF, mediante la administración intraperitoneal de la proteína, se obtenían, en efecto, números (cantidades) mayores de neutrófilos circulantes y de macrófagos peritoneales cicantes; asimismo, se observó un aumento en el desarrollo y diferenciación de los macrófagos CD5+ (CD5 positivos) en la cavidad peritoneal de los roedores (Metcalf *et al.*, (1987) *Exp. Hematol.* 15:1-9).

[0008] Se ha demostrado también que el GM-CSF puede “cebar” (inducir) a las células para que respondan de una manera más intensa y sinérgica a un segundo estímulo, como el LPS o el interferón gamma (Hart *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141:1516-1521). Se puede “cebar” a ratones, tanto *in vitro* como *in vivo*, con GM-CSF, para que produzcan mayores niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes, tras un posterior estímulo con LPS o con TNF-alfa.

[0009] En una situación clínica, la administración de GM-CSF a pacientes en diálisis peritoneal ocasionó un marcado reclutamiento de macrófagos (Selgas *et al.*, 1996, *Kidney Lit.* 50:2070- 2078). Es interesante que, conforme a lo previsto a raíz de los estudios con roedores, la administración de GM-CSF en una situación clínica puede generar una producción acentuada de citoquinas inflamatorias, así como posibles efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, cuando se trató con GM-CSF a pacientes que padecían artritis reumatoide con el fin de corregir la neutropenia asociada al síndrome de Felty, la artritis se vio exacerbada (Hazenber *et al.*, 1991, *Blood* 74:2769-2770). En otra situación clínica, tras quimioterapia para el cáncer, el tratamiento con GM-CSF empeoró la artritis reumatoide (de Vries *et al.*, (1991) *J. Immunol.* 163:4985-4993). La administración sistémica de GM-CSF a donantes humanos incrementó la capacidad de los granulocitos aislados para producir superóxido, acentuó la citotoxicidad de los monocitos circulantes y tuvo como consecuencia un aumento en el número de monocitos (Perkins *et al.*, 1993, *Am J. Hematol.* 43:279-285). La expresión aberrante de GM-CSF está asociada también con neumopatías en humanos. Por ejemplo, parece que el aumento de la expresión del GM-CSF en el pulmón, a causa de irritantes de escasa importancia, endotoxinas o infecciones, predispone a una desviación de la respuesta inmunitaria, con abundancia de linfocitos TH2, y al asma (Eisenbarth *et al.* (2002) *J. Exp. Med.* 196:1645-1651). De los estudios que se acaban de describir resumidamente parece desprenderse que el GM-CSF desempeña una función en la activación de los procesos inflamatorios, mediante el reclutamiento de células, una mayor supervivencia celular y/o el “cebado” para la activación.

[0010] Diversos datos obtenidos por asociación, así como datos experimentales, parecen indicar que el GM-CSF desempeña una función en el asma. Se ha demostrado que el uso de anticuerpos neutralizadores, en un modelo murino del asma, suprime los fenotipos asmáticos (Yamashita (2002) *Cell Immunol.* 219:92); por otra parte, en varios estudios en los que se midieron las citoquinas en líquido de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes asmáticos, se observó un aumento en los niveles de GM-CSF (Gajewska (2003) *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2:279).

[0011] La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica, y existen numerosos indicios de que el GM-CSF puede estar implicado en ella. Se han observado niveles elevados de GM-CSF en las lesiones de la AR (Xu *et al.* (1989) *J. Clin. Invest.* 83:876) e, *in vitro*, las células articulares residentes (condrocitos y fibroblastos sinoviales) producen GM-CSF tras la estimulación de dichas células con citoquinas inflamatorias tales como IL-1 y TNF-alfa (Leizer *et al.* (1990) *Blood* 76:1989). La artritis inducida por colágeno (CIA, por sus siglas en inglés) en el ratón es un modelo autoinmune de la AR, y depende de respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares al colágeno de tipo II (CII) (Seki *et al.* (1988) *J. Immunol.* 140,1477). Históricamente, este fenotipo de AR se ha limitado a las estirpes de ratón con haplotipos H-2q o H-2r, y, por lo general, se pone en práctica en ratones DBA/1 (Wooley (1988) *Methods Enzymol.* 162:361). Se llevó a cabo una serie de estudios en ratones transgénicos que eran homocigóticos nulos en cuanto al “locus” del GM-CSF murino (Stanley *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5592). Un hecho interesante es que los ratones deficientes en GM-CSF son resistentes a la inducción de la artritis inducida por colágeno, a diferencia de sus compañeros de camada de tipo natural, empleados como control (Campbell *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:3639-3644).

[0012] También de interés resulta el hecho de que los ratones nulos a GM-CSF presentan un aclaramiento de surfactante alterado, que tiene como consecuencia una proteinosis alveolar pulmonar (PAP) murina que se parece mucho a la misma enfermedad en humanos, tal y como se describe en la presente invención. Además, el fenotipo de la PAP puede corregirse mediante administración, específica de pulmón, del gen del GM-CSF (Zsengaller *et al.* (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:2101-2109), aerosolización de GM-CSF o trasplante de médula ósea para la reconstitución hematopoyética (Reed *et al.* (1999) *Am. J. Physiol.* 276:L556-L563; Nishinakamura *et al.* (1996) *J. Exp. Med.* 183:2657-2662).

[0013] La proteinosis alveolar pulmonar (PAP) de seres humanos adultos es una enfermedad infrecuente (“rara”) caracterizada por la acumulación de fosfolípidos, así como de proteínas surfactantes, en los alvéolos. Se ha formulado la hipótesis de que la PAP se debe a la incapacidad de los macrófagos y células epiteliales de tipo II alveolares para retirar el exceso de surfactante (Mazzone *et al.* (2001) *Clev. Clin. J. Med.* 68:977-992). Por lo general, para llegar a un diagnóstico de PAP hay que realizar una biopsia a pulmón abierto, y el tratamiento estándar

para esta enfermedad es la retirada física del surfactante acumulado, mediante lavado pulmonar completo (Shah *et al.* (2000) *Thorax* 55:67-77). Además, se ha demostrado que los pacientes con PAP tienen anticuerpos neutralizadores circulantes contra el GM-CSF, lo que implica que esta citoquina (el GM-CSF) es causante de dicha enfermedad. No está claro si esta respuesta autoinmune es específica del GM-CSF. No obstante, se ha demostrado que un subconjunto de pacientes con PAP mejoran con el tratamiento a base de GM-CSF, lo que viene a respaldar la hipótesis de que la ausencia de GM-CSF, ya sea por alteración génica o por neutralización (del GM-CSF) mediada por anticuerpos, tiene como consecuencia la aparición y desarrollo de PAP.

[0014] Existen también evidencias que apuntan a que el GM-CSF desempeña una función en el cáncer. Por ejemplo, el GM-CSF desempeña una función en la génesis y la progresión de las leucemias, tales como la leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ), (Emanuel PD (2004) *Curr. Hematol. Rep.* 3:203-209). La LMMJ se caracteriza por la alteración de la hemopoiesis normal, lo que tiene como resultado una proliferación, excesiva e inadecuada, de células mieloides inmaduras en la médula ósea. Estas células hematopoyéticas cancerosas proliferativas pueden metastatizar en el bazo y en el hígado. Un hecho interesante es que los pacientes con LMMJ son hipersensibles al GM-CSF y muestran características patológicas similares a las que muestran los ratones transgénicos en los que hay sobreexpresión de GM-CSF (Lang *et al.* (1987) 51:675-86). Además, se ha demostrado que el GM-CSF promueve el crecimiento y la supervivencia de las células de las LMMJ (Emanuel *et al.* (1991) *Blood* 77:925-9). En el modelo transgénico murino de la LMMJ, un bloqueo del GM-CSF redujo la carga celular de la LMMJ en la médula ósea, la sangre y el bazo (Iversen *et al.* (1997) *Blood*, 90:4910-7).

[0015] Los modelos patológicos murinos en los que se inhibe la expresión del GM-CSF, así como las enfermedades humanas, tales como la PAP, en las que se generan anticuerpos circulantes contra el GM-CSF en la circulación sistémica, dejan claro que esta citoquina es un mediador importante de patologías. Por lo tanto, un enfoque con el que concebir/developar un fármaco que pueda antagonizar la actividad del GM-CSF, ya comprenda ello desarrollar un anticuerpo contra la citoquina en sí, o bloquear el receptor del GM-CSF, puede constituir un tratamiento valioso en seres humanos. Se han generado varios anticuerpos policlonales y monoclonales contra la molécula de GM-CSF recombinante. Por ejemplo, Befly *et al.* ((1994), *Hybridoma* 13:457-468), generaron anticuerpos policlonales contra el GM-CSF recombinante humano en conejos de la raza New Zealand White, así como anticuerpos monoclonales en ratones Balb/c. Dichos anticuerpos de conejo y algunos de los anticuerpos monoclonales murinos fueron capaces de neutralizar la actividad del GM-CSF en una prueba de proliferación celular llevada a cabo *in vitro* con células M07e. En estudios adicionales, Nice *et al.* (1990, *Growth Factors* 3,159-169) "mapearon" el epítipo del lugar de unión de un anticuerpo neutralizador murino anti-GM-CSF (el anticuerpo LMM102). Se delineó un epítipo bien definido mediante la generación de una serie de productos de la digestión derivados de GM-CSF recombinante humano, usando un fraccionamiento por HPLC de fase inversa para separar los fragmentos, seguido de una digestión adicional, con *S. aureus* V8, de los fragmentos tripticos, a fin de definir un producto que comprendía dos péptidos unidos por un enlace disulfuro. Dempsey *et al.* (1990, *Hybridoma* 9,545-558) generaron tres anticuerpos murinos contra el GM-CSF humano que neutralizaron el GM-CSF en un sistema de ensayo *in vitro*, con una CE50 comprendida en un intervalo de 0,1 a 1,7 nanomolar. Dichos anticuerpos no reaccionaron con el GM-CSF murino ni con otras citoquinas relacionadas. Todos los anticuerpos arriba descritos son reactivos útiles para la detección de GM-CSF en suero humano, así como para ensayos *in vitro* en los que se desea inhibir la señalización del GM-CSF. Sin embargo, todos esos anticuerpos tienen escaso valor terapéutico, dado que se obtienen de un sistema murino o de conejo. Se han intentado generar anticuerpos quiméricos a partir de anticuerpos murinos, mediante subclonación del dominio variable del anticuerpo murino anti-GM-CSF en el esqueleto de moléculas humanas. Esta estrategia ha tenido como consecuencia un anticuerpo quimérico que puede neutralizar el GM-CSF *in vitro* y que puede resultar útil como anticuerpo terapéutico (WO 03/068924 A2).

[0016] Un aspecto importante de un anticuerpo terapéutico es su capacidad para generar funciones efectoras inmunes, como por ejemplo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, se ha demostrado que los MAbs de roedores median escasamente las funciones efectoras en seres humanos, a causa de las diferencias de secuencia en la región Fc; por ello, se requiere quimerización o humanización para obtener propiedades farmacológicas óptimas. Además, es posible que los MAbs con secuencias plenamente humanas no puedan generar ADCC si se producen en células "host" no humanas que puedan alterar el patrón de glicosilación nativo de los MAbs (Shinkawa *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466-73).

[0017] En vista de estos hechos, se prefiere la producción de anticuerpos terapéuticos mediante células B humanas. Ya se han notificado anteriormente métodos para la generación de hibridomas que secretan MAbs humanos (WO2004/046330). Los MAbs terapéuticos generados por células B humanas son capaces de ejercer funciones efectoras en seres humanos, y su inmunogenicidad es muy limitada, dada su estructura nativa humana. Ya se ha notificado anteriormente la generación de líneas de hibridoma o de líneas linfoblastoides transformadas mediante el virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), obtenidas de células B humanas (Kirman *et al.* (2002) *Hybrid Hybridomics* 21:405-14; Boemer *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:86-95; Zafiroopoulos *et al.* (1997) *J. Immunol. Methods* 200:181-90); sin embargo, la información que se tiene sobre la caracterización de dichos anticuerpos y sobre dichas líneas, en lo referente a su estabilidad a largo plazo, así como sobre si resultan adecuados/as para procesos de fabricación, y sobre las propiedades farmacológicas de dichos anticuerpos, es limitada (van Dijk *et al.* (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:368-74).

[0018] Por lo tanto, existe la necesidad de obtener anticuerpos terapéuticos humanos para el tratamiento de la inflamación asociada a las enfermedades infecciosas, las enfermedades inflamatorias, los trastornos autoinmunes, así como a otras enfermedades, como el cáncer. Además, es deseable que dichos anticuerpos generen funciones efectoras inmunes, y que sean bien tolerados en pacientes humanos. La presente invención viene a satisfacer dichas necesidades, así como otras necesidades presentes desde hace mucho tiempo.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano que se expresa recombinantemente y que se une de manera específica al GM-CSF, y dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una CDR1 que tiene una SEC N.º ID: 40, una CDR2 con una SEC N.º ID: 41, y una CDR3 con una SEC N.º ID: 42, así como una cadena ligera que comprende una CDR1 con una SEC N.º ID: 43, una CDR2 con una SEC N.º ID: 44, y una CDR3 con una SEC N.º ID: 45, y la afinidad de unión de dicho anticuerpo contra el GM-CSF humano tiene una constante de disociación (K_D) inferior a 1×10^{-10} M. En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo de la invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o composición de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, un cáncer o una enfermedad infecciosa mediados por el GM-CSF.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos se refieren a diversos anticuerpos. A fin de despejar dudas, el anticuerpo de la invención es el cubierto por las reivindicaciones, y otros anticuerpos a los que se hace referencia en los dibujos se mantienen con una finalidad comparativa y no forman parte de la invención.

La Figura 1 ilustra la prueba ELISA, llevada a cabo con un grupo de antígenos, para la selección de MABs humanos específicos de antígeno. Tres MABs humanos específicos de GM-CSF (E5, G7 y E10) reaccionaron con el GM-CSF humano, y con ninguno de los demás antígenos presentes en el grupo. El anticuerpo 215 es un MAB murino que se une al GM-CSF humano (hGM-CSF) y al GM-CSF (mGM-CSF) murino.

[0023] Las Figuras 2A y 2B ilustran la alta especificidad de los MABs humanos por el GM-CSF humano nativo. Como se ilustra en la Figura 2A, se unió GM-CSF humano soluble a células de hibridoma murinas que presentaban una inmunoglobulina (Ig) de superficie celular contra el GM-CSF humano. Después, se añadió el MAB E5 a la reacción y se midió su unión al GM-CSF humano, usando para ello una Ig de cabra anti-humana, conjugada con FITC (fluoresceína isotiocianato). El E5 no se unió a ninguna de las proteínas de superficie expresadas por las células de hibridoma murinas (panel del medio); únicamente se unió al GM-CSF soluble capturado por la Ig de superficie celular (panel inferior). Como se ilustra en la Figura 2B, el GM-CSF humano marcado con ficoeritrina (PE-GM, por sus siglas en inglés) puede reaccionar con la Ig expresada en la superficie de las células de la línea celular E10. El exceso de GM-CSF sin marcar (panel inferior) compitió por la unión al PE-GM.

[0024] En la Figura 3 se ilustra la secreción de IgG que se une a antígeno, por parte de células de hibridoma que habían sufrido un cambio isotípico. Las células de hibridoma E5 (parentales) fueron tratadas conforme a como se describe en el apartado "Materiales y métodos". Usando un método de análisis y selección basado en ELISPOT, se identificaron clones de hibridoma que habían sufrido un cambio isotípico. A fin de evaluar la unión de las IgM o de las IgG, se llevó a cabo un ELISA en el que se midió la unión específica al GM-CSF humano presente en placas revestidas con dicho GM-CSF humano. Los MABs IgG con cambio isotípico mostraron una unión a antígeno comparable a la de la IgM parental.

[0025] En la Figura 4 se ilustra la inhibición del crecimiento, dependiente de GM-CSF, de líneas celulares TF-1, con MABs completamente humanos. Se cultivó la línea celular TF-1 de eritroleucemia humana, dependiente de GM-CSF humano (ATCC, Virginia, Estados Unidos de América), en medio RPMI 1640 completo que contenía 10 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). El día anterior al experimento, se cultivaron células TF-1 en FBS (suero fetal bovino) al 0,1% en ausencia de GM-CSF. Las células TF-1 privadas se cosecharon y se lavaron dos veces con medio de ensayo (RPMI simple con BSA [seroalbúmina bovina] al 0,5%). Dichas células se resuspendieron en medio de ensayo y se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una concentración de 10000 células/pocillo. Los pocillos contenían medio de ensayo, 100 pg/ml de GM-CSF, o GM-CSF incubado previamente durante una hora con las Igs de la prueba o con Igs isotipo de control, a las concentraciones indicadas en la figura. Transcurridos 3 días, se añadieron 40 µl de reactivo Cell Titer (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) a cada pocillo, y se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en espectrofotómetro, y se restó de las muestras el "ruido de fondo" ("fondo") del medio. Se calculó el porcentaje de neutralización del GM-CSF, de la siguiente manera: $100 - [(D.O. \text{ con Ig} / D.O. \text{ sin Ig}) \times 100]$.

[0026] La Figura 5A ilustra los resultados obtenidos con ELISA, que muestran que todos los subclones de E5-3D2 probados secretan niveles altos de Ig. Se cultivó la línea E5-3D2 de hibridoma durante 60 generaciones y luego se evaluó la estabilidad de la producción, mediante análisis de la frecuencia de las células productoras. Se

seleccionaron al azar subclones (X1-X10) obtenidos de células 3D2 mediante limitación de la dilución, y se midió su producción de Ig, mediante un ensayo basado en ELISA. La absorbancia a 405 nm se normalizó por tamaño de colonia, mediante inspección visual de los pocillos que contenían las células. La Figura 5B muestra que la productividad específica medida durante la fase logarítmica fue de 24 pg/célula/día tras la inoculación de células 3D2 en un biorreactor agitado que contenía 1 litro de medio sin suero y la producción de Ig y el registro del número de células viables desde el día 1 hasta el 5.

[0027] La Figura 6A muestra los resultados de un ejemplo de una delección de un solo nucleótido en el marcador BAT presente en células de hibridoma E5 tratadas con inhibidores de la reparación de discordancias. Las líneas de puntos que atraviesan el pico central del histograma representan el tamaño del fragmento de tipo natural (wt, por sus siglas en inglés) o contraído (~1 nt). En la Figura 6B, se indica que se sembraron, en microplacas, células parentales y células cuya reparación de discordancias estaba inhibida, y se obtuvieron 3763 y 2437 clones secretores de Ig (D.O. > 0,2), respectivamente. Las concentraciones de Ig se determinaron mediante ELISA, y la frecuencia de los clones con valores de D.O. superiores a 1 se registró y expresó en forma de porcentaje del número total de clones analizados.

[0028] La Figura 7 proporciona un diagrama de flujo en el que se describe cada paso para la generación de una línea celular de hibridoma completamente humana.

[0029] En la Figura 8 se ilustra un ensayo ELISA, llevado a cabo con un grupo de antígenos, para la selección de MAbs humanos específicos de antígeno. Tres huMAbs (MAbs humanos) específicos de GM-CSF (E5, G7, y E10 [que no se describen aquí]) reaccionaron con el GM-CSF humano, y con ninguno de los demás antígenos presentes en el grupo. El recubrimiento eficiente con antígenos se optimizó usando MAbs específicos de los diversos antígenos, en aras de una mayor sensibilidad del ensayo. 615 y 215 son dos MAbs murinos anti-GM-CSF humano.

[0030] En la Figura 9 se muestra la determinación del isotipo del MAb E10. Para determinar el isotipo del E10, se llevó a cabo un análisis estándar usando anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgM, anti-LK, y anti-Lλ Fc humanos específicos, a fin de obtener el isotipo.

[0031] En la Figura 10 se ilustra un análisis Western (electroinmunotransferencia Western) llevado a cabo con los MAbs E10 y G9. Se llevaron a cabo análisis "Western blot" (electroinmunotransferencia Western) con E10 y G9 a fin de determinar si podía existir una reacción cruzada entre los anticuerpos y el GM-CSF recombinante humano. mAb215 es el anticuerpo monoclonal neutralizador murino anti-GM-CSF humano que se usa como control positivo. El carril 1 se cargó con lisado de células tumorales, como control negativo proteico. El carril 2 se cargó con 500 ng de rh GM-CSF (PeProTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). Como se ilustra en la Figura 5, E10 y G9 reaccionaron con el GM-CSF humano.

[0032] En la Figura 11 se ilustra un análisis con BIACORE, llevado a cabo con el E10. E10.20 mostró una constante de velocidad de asociación (k_a) = $2,47 \times 10^4$, una constante de velocidad de disociación (k_d) = $2,16 \times 10^{-5}$ y una afinidad global (K_D) de 0,87 nM.

[0033] En la Figura 12 se muestra la determinación del isotipo del MAb G9. Para determinar el isotipo del G9, se llevó a cabo un análisis estándar usando anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgM, anti-Lκ, y anti-Lλ Fc humanos específicos, a fin de obtener el isotipo (en muestras dobles, Fig 3).

[0034] En la Figura 13 se ilustra un análisis con BIACORE, llevado a cabo con el G9. 10G9.1 mostró una constante de velocidad de asociación (k_a) = $8,47 \times 10^6$, una constante de velocidad de disociación (k_d) = $9,27 \times 10^{-5}$ y una afinidad global (K_D) de 0,87 nM.

[0035] En la Figura 14 se ilustra una estrategia de mapeado del epítipo del G9. Los péptidos solapados que se emplearon para mapear el sitio de unión del epítipo del G9 se corresponden con secuencias de aminoácidos que tienen las SEC N.º ID: 35-38, y 64-85.

[0036] En la Figura 15 se ilustra un análisis de mapeado del epítipo del G9, que se llevó a cabo empleando un análisis Western blot con péptidos solapados que abarcan la secuencia de la proteína GM-CSF humana; dichos péptidos solapados se corresponden con secuencias de aminoácidos que tienen las SEC N.º ID: 35-38, y 65-86. Los péptidos positivos al anticuerpo comprenden las SEC N.º ID: 35-38.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0037] En la especificación y en las reivindicaciones se usan diversos términos relacionados con aspectos de la presente invención. A menos que se indique de otro modo, se debe dar a dichos términos el significado que tienen ordinariamente en este campo del conocimiento. Otros términos, definidos específicamente, se deben entender de manera acorde con la definición de ellos que aquí se proporciona.

[0038] Debe entenderse que esta invención no se limita a los reactivos, compuestos, composiciones o sistemas

biológicos que se emplean aquí en particular, que, por supuesto, pueden variar. Asimismo, debe entenderse que la terminología aquí empleada se usa con la única finalidad de describir realizaciones concretas, y no debe interpretarse que limite en modo alguno el ámbito de la presente invención. Tal y como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “uno”, “una”, “el” y “la” engloban también las formas plurales, a menos que se desprenda de otro modo del contenido. Por ejemplo, cuando aquí se hace referencia a “una célula”, ello comprende también una combinación de dos o más células, y así en otros casos en general.

[0039] Cada intervalo aquí citado comprende todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos, así como los numerales concretos en ellas/ellos contenidos.

[0040] En este contexto, el término “aproximadamente” (o “aproximado” o “alrededor de unos” o “en torno a”, etc.) se usa al hacer referencia a un valor medible como, por ejemplo, una cantidad, una duración en el tiempo, y similares, y se debe entender que engloba variaciones del $\pm 20\%$ o del $\pm 10\%$, más preferiblemente del $\pm 5\%$, aún más preferiblemente del $\pm 1\%$, e incluso más preferiblemente del $\pm 0,1\%$, respecto del valor especificado, dado que tales variaciones resultan apropiadas para la realización de los métodos aquí descritos.

[0041] El término “enfermedad infecciosa” incluye, entre otras posibilidades: infección por un patógeno, por un virus, por una bacteria, por un hongo o por un parásito. Son ejemplos de virus o de infecciones por virus, entre otros, los siguientes: síndrome respiratorio agudo severo (SARS, por sus siglas en inglés, causado por coronavirus asociado a SARS), hepatitis tipo B o tipo C, influenza (gripe), varicela, adenovirus, virus *herpes simplex* tipo I o tipo II, virus de la peste bovina (rinderpest), rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus respiratorio sincitial, papilomavirus, papovavirus, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus Coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo I o tipo II. Son ejemplos de bacterias, entre otros, los siguientes: ébola, *Staphylococcus* A-E, *Plasmodium* (malaria), *M. tuberculosis*, micobacterias, micoplasmas, *Neisseria* y *Legionella*. Son ejemplos de parásitos, entre otros, los siguientes: *Rickettsia* y *Chlamydia*.

[0042] El término “enfermedades inflamatorias” incluye, entre otras, las siguientes posibilidades: patologías inmunes y autoinmunes agudas y crónicas, como, entre otras, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias renales y trastornos inflamatorios pulmonares como el asma y la neumopatía obstructiva crónica (“enfermedad pulmonar obstructiva crónica”, o EPOC, por sus siglas), esclerosis múltiple y encefalomiелitis autoinmune.

[0043] Una “enfermedad autoinmune” es una enfermedad o trastorno que se deriva de los propios tejidos de un individuo y está dirigida contra los mismos, que se hereda genéticamente o que se manifiesta produciendo un estado patológico resultante de dicho mecanismo. Son ejemplos de enfermedades autoinmunes, entre otros, los siguientes: artritis (artritis reumatoide, como, por ejemplo, artritis aguda, artritis reumatoide crónica, gota o artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de la enfermedad de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral, y artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartrosis crónica primaria, artritis reactiva, y espondilitis anquilosante), enfermedades cutáneas hiperproliferativas e inflamatorias, psoriasis tal como la psoriasis en placas, psoriasis en gotas, psoriasis pustular, y psoriasis ungueal, atopía incluidas enfermedades atópicas tales como rinitis alérgica y síndrome de Job, dermatitis incluidas dermatitis por contacto, dermatitis por contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis inespecífica, dermatitis de contacto por irritación primaria, y dermatitis atópica, síndrome de HiperIgM ligado al cromosoma X, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluida la urticaria autoinmune crónica, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma (incluido el escleroderma sistémico), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como la EM óptico-espinal, EM primaria progresiva (EMPP), y EM remitente recurrente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, colitis, tal como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colágena, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante, y colitis transmural, así como enfermedad inflamatoria intestinal autoinmune), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de dificultad respiratoria, incluidos el síndrome de dificultad respiratoria del adulto y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), meningitis, inflamación de la totalidad o de parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, espondilitis reumatoide, sinovitis reumatoide, angioedema hereditario, lesiones de los nervios craneales, como en el caso de la meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito escrotal, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, pérdida súbita de la audición a causa de problemas autoinmunes, enfermedades mediadas por IgE, tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tales como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tallo cerebral, uveítis, tales como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis faecoantigénica, uveítis posterior, o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico, tales como glomerulonefritis crónica o aguda tales como GN primaria, GN mediada por inmunidad, GN membranosa (nefropatía membranosa),

GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN membranoproliferativa o proliferativa membranosa (GNMP), incluidas la de tipo I y la de tipo II, y GN rápidamente progresiva, nefritis proliferativa, insuficiencia endocrina poliglandular autoinmune, balanitis incluidas la balanitis circunscrita plasmocelular, balanopostitis, eritema anular centrífugo, eritema discrómico perstans, eritema multiforme, granuloma anular, líquen nítido, líquen escleroso, líquen atrófico, líquen simple crónico, líquen espinuloso, líquen plano, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, pioderma gangrenoso, problemas alérgicos, respuestas alérgicas, reacción alérgica, eccema incluidos eccema alérgico o atópico, eccema asteatótico, eccema dishidróico, y eccema vesicular palmoplantar, asma, tal como asma bronquial y asma autoinmune, trastornos en los que hay infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunitarias contra antígenos extraños, tal como con los grupos sanguíneos A-B--O durante el embarazo, enfermedad inflamatoria crónica pulmonar, miocarditis autoinmune, síndrome de adhesión leucocitaria deficiente, lupus, incluidos lupus nefrítico, *lupus cerebritis* (cerebritis lúpica), lupus infantil, lupus no renal, lupus extrarrenal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, lupus alopécico, lupus eritematoso sistémico (LES) tales como LES cutáneo o LES cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (SLN), y lupus eritematoso disseminado, *diabetes mellitus* juvenil (tipo I) incluida la *diabetes mellitus* insulino-dependiente infantil (DMID), *diabetes mellitus* del adulto (diabetes de tipo II), diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, afectaciones diabéticas de los grandes vasos, respuestas inmunes asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluidas la granulomatosis linfomatoide y la granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, trastornos inflamatorios de los vasos sanguíneos, incluidos vasculitis, vasculitis de vasos grandes (incluida la polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (arteritis de Takayasu)), vasculitis de vasos medianos (incluidas la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrotizantes, tales como vasculitis necrotizantes sistémicas, y vasculitis asociadas a ANCA (siglas, en inglés, de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo), tales como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS, por sus siglas en inglés), vasculitis de vasos pequeños asociadas a ANCA, arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia Coombs-positiva, anemia de Diamond-Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune, incluida la anemia hemolítica autoinmune (AHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia/aplasia eritrocítica pura, deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades en las que hay diapédesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome lesional multiorgánico/síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), tal como los secundarios a septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad anti-membrana basal glomerular, síndrome antifosfolípido (síndrome de anticuerpos antifosfolípido), neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behcet, enfermedad/síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, enfermedad/síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide, tales como penfigoide buloso y penfigoide cutáneo, pénfigos (incluidos pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo/penfigoide mucomembranoso, y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad/síndrome de Reiter, lesiones por calor, preeclampsia, un trastorno por complejos inmunes (inmunocomplejos), tal como nefritis por complejos inmunes, nefritis mediada por anticuerpos, polineuropatías, neuropatías crónicas, tales como polineuropatías asociadas a IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (por ejemplo, como la que aparece en pacientes con infarto de miocardio), incluidas púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), púrpura postransfusional, trombocitopenia inducida por heparina, y trombocitopenia autoinmune o mediada por inmunidad, tal como púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), incluidas la PTI crónica y la PTI aguda, escleritis, tales como queratoescleritis idiopática, epiescleritis, enfermedades autoinmunes de testículos y ovario, incluidas orquitis autoinmune, ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes, incluidas tiroiditis tales como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmune, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Graves, síndromes poliglandulares tales como los síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluidos síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de la persona rígida, encefalomiелitis, tales como encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), *miastenia gravis*, tales como miastenia gravis asociada a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclonos o síndrome de opsoclonos-mioclono, y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoides, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis intersticial linfocítica, bronquiolitis obliterante (no asociada a trasplante) frente a neumonía intersticial inespecífica, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía por IgA idiopática, dermatosis ampollosa IgA lineal (por depósito lineal de IgA), dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis pustulosa subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis, tales como cirrosis biliar primaria y cirrosis asociada a neumonía, síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca, esprúe celíaco (enteropatía por gluten), esprúe refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), enfermedades de las arterias coronarias, enfermedades autoinmunes del oído, tales como enfermedad autoinmune del oído interno, pérdida de audición por autoinmunidad, policondritis, tal como policondritis refractaria o recidivante, proteinosis alveolar pulmonar, síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, parálisis de Bell, síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado al Herpes zóster, amiloidosis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, incluida una linfocitosis de células B monoclonal (*por ejemplo*, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significado incierto, GMSI), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías, tales como epilepsia, migraña, arritmia, alteraciones musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica, y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal o

segmentaria, o glomeruloesclerosis focal-segmentaria (GEFS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepático autoinmune, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes, tales como las enfermedades desmielinizantes autoinmunes y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, disfunción de la motilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, por ejemplo, debida a anticuerpos anti-espermatozoos, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, abortos recurrentes, la enfermedad denominada "pulmón del granjero" (neumonitis alérgica), eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, "pulmón del cuidador de aves", angeítis granulomatosa alérgica, angeítis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis, tales como alveolitis alérgica y alveolitis fibrósica, neumopatía intersticial (enfermedad pulmonar intersticial), reacción a transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias, tales como leishmaniasis, tripanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Samper, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmítis, eritema elevatum diutinum, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, tales como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica), o ciclitis de Fuchs, púrpura de Schönlein-Henoch, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SCID (inmunodeficiencia combinada grave), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), infección por ecovirus, septicemia, endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubeola, síndromes posvacunación, infección congénita por el virus de la rubeola, infección por el virus de Epstein-Barr, sarampión, síndrome de Evans, insuficiencia gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis poyestreptocócica, tromboangitis obliterante, tiroxicosis, tabes dorsal, coroiditis, polimialgia/arteritis de células gigantes, neumonitis por hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambios mínimos, lesión benigna familiar y lesión por isquemia-reperusión, reperusión en trasplante de órganos, autoinmunidad retiniana, inflamación articular, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica/obstrucción crónica de las vías respiratorias, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioescleróticos, aspermiogénesis, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmítis faeoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad/síndrome de Hamman-Rich, pérdida auditiva neurosensorial, hemoglobinuria paroxística, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema primario idiopático, nefrosis, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, poliirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, timoma no maligno, vitiligo, síndrome de shock tóxico, intoxicaciones alimentarias, trastornos/problemas en los que hay infiltración de células T, adhesión leucocitaria deficiente, respuestas inmunes asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades en las que hay diapédesis leucocitaria, síndrome lesional multiorgánico/síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad anti-membrana basal glomerular, neuritis alérgicas, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, oftalmía simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome nefrítico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, síndrome poliglandular autoinmune de tipo I, hipoparatiroidismo idiopático del adulto, cardiomiopatías, tales como cardiomiopatía dilatada, epidermólisis ampollosa adquirida, hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrítico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidal, frontal, maxilar o esfenoidal, un trastorno relacionado con los eosinófilos, tal como eosinofilia, eosinofilia pulmonar infiltrativa, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loeffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis broncopulmonar, aspergiloma, o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativas, enfermedad poliendocrina autoinmune, colangitis esclerosante, escleritis, epiescleritis, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria infantil, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia-telangiectasia, angiectasia, trastornos autoinmunes asociados a colagenopatías, reumatismo, enfermedades neurológicas, linfadenitis, reducción de la respuesta presora, disfunciones vasculares, lesiones tisulares, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral, enfermedades asociadas a la vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesiones por reperusión, trastornos de isquemia-reperusión, lesiones, por reperusión, del tejido miocárdico o de otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatorias, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia multiorgánica, enfermedades ampollosas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes granulocíticos asociados a transfusiones, toxicidad inducida por citoquinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica intratable, pielonefritis, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis.

[0044] El término "variantes modificadas conservadoramente" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, el término "variantes modificadas conservadoramente" se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, si el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, se refiere a secuencias esencialmente idénticas. A causa de la degeneración que sufre naturalmente el código genético, cualquier proteína dada es codificada por un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican, todos ellos, el aminoácido alanina. Por eso, en cada posición en la que una alanina es especificada por un codón, dicho codón puede modificarse de manera que pase a ser cualquiera de los codones correspondientes aquí descritos, sin que el polipéptido codificado se vea alterado.

Tales variaciones en/de los ácidos nucleicos se denominan “variaciones silenciosas”, que son un tipo de variaciones modificadas conservadoramente. Cada una de las secuencias de ácidos nucleicos que aquí se describe y que codifica un polipéptido describe también cada una de las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico. Los expertos en la materia sabrán que cada codón de un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para la metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para el triptófano) puede modificarse a fin de obtener una molécula funcionalmente idéntica. Por lo tanto, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita respecto del producto de expresión, aunque no respecto de las secuencias de las sondas que de hecho se usan.

[0045] El término “recombinante”, cuando se usa en referencia, por ejemplo, a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o de una proteína heteróloga, o mediante la alteración de un ácido nucleico nativo o de una proteína nativa, o bien, indica que la célula se ha derivado de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que, de otro modo, se expresan anormalmente, se expresan menos o no se expresan en absoluto.

[0046] Las expresiones “ácido nucleico” o “secuencia de polinucleótidos” se refieren a un polímero, de cadena única o doble, de bases desoxirribonucleótido o ribonucleótido, que se lee desde el extremo 5' hasta el extremo 3'. Los ácidos nucleicos pueden comprender también nucleótidos modificados que permitan una lectura correcta por parte de una polimerasa y que no alteren la expresión de un polipéptido codificado por el ácido nucleico, incluidos, por ejemplo, variantes modificadas conservadoramente.

[0047] “Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan aquí como sinónimos para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Dichos términos son aplicables a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un compuesto químico artificial mimético de un aminoácido correspondiente que se da de forma natural, así como a polímeros de aminoácidos que se dan de forma natural y a polímeros de aminoácidos que no se dan de forma natural. Los polipéptidos de la invención comprenden las variantes modificadas conservadoramente. Los expertos en la materia saben que las sustituciones, deleciones o adiciones en la secuencia de un ácido nucleico, un péptido, un polipéptido o una proteína que alteren, añadan o eliminen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada son una “variante modificada conservadoramente”, en la que la alteración tiene como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Son bien conocidas, en este campo de la técnica, las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes conservadoramente modificadas son adicionales a las variantes polimórficas, a los homólogos inter-especies y a los alelos de la presente invención, y no los excluyen. Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras (sustituciones de unos aminoácidos con otros): 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparraguina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (33). El término “sustitución conservadora” comprende asimismo el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido, siempre que el polipéptido resultante muestre la actividad de unión requerida.

[0048] “Aminoácido” se refiere a aminoácidos que se dan en la naturaleza y a aminoácidos sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y a miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se dan en la naturaleza. Los aminoácidos que se dan en la naturaleza son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que son modificados posteriormente, como, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. “Análogo de aminoácido” se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se da en la naturaleza, a saber, un carbono α unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, como, por ejemplo, homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metilsulfonio-metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se da en la naturaleza. “Mimético de aminoácido” se refiere a un compuesto químico que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a la de un aminoácido que se da en la naturaleza.

[0049] En esta invención, se puede hacer referencia a los aminoácidos citando sus símbolos de tres letras, que son ampliamente conocidos, o citando sus símbolos de una letra recomendados por el Comité mixto de nomenclatura bioquímica de la IUPAC y la IUB (véase la Tabla 1 a continuación). De igual modo, se puede hacer referencia a los nucleótidos citando sus códigos de una letra, que están ampliamente aceptados.

TABLA 1		
SÍMBOLO		
De 1 letra	De 3 letras	AMINOÁCIDO
Y	Tyr	L-tirosina
G	Gly	L-glicina
F	Phe	L-fenilalanina

M	Met	L-metionina
A	Ala	L-alanina
S	Ser	L-serina
I	Ile	L-isoleucina
L	Leu	L-leucina
T	Thr	L-treonina
V	Val	L-valina
P	Pro	L-prolina
K	Lys	L-lisina
H	His	L-histidina
Q	Gln	L-glutamina
E	Glu	Ácido L-glutámico
W	Trp	L-triptófano
R	Arg	L-arginina
D	Asp	Ácido L-aspártico
N	Asn	L-asparaguina
C	Cys	L-cisteína

[0050] Debe señalarse que, en la presente invención, todas las secuencias de aminoácidos se representan mediante fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha está en la dirección convencional de extremo aminoterminal a extremo carboxiterminal.

[0051] Tal y como aquí se usa, el término "*in vitro*" o "*ex vivo*" se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que tienen lugar dentro de un entorno artificial; por ejemplo, entre otras posibilidades, tubos de ensayo y cultivos celulares. El término "*in vivo*" se refiere a un entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que tienen lugar dentro de un entorno natural.

[0052] "Farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y las variaciones gramaticales de dichos términos, cuando hacen referencia a composiciones, transportadores, diluyentes y reactivos, se usan como sinónimos y significan que los materiales en cuestión son capaces de ser administrados a un ser humano sin que produzcan efectos fisiológicos no deseables de un nivel que haría que fuese contraproducente administrar la composición.

[0053] El término "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a reactivos, excipientes, células, compuestos, materiales, composiciones y/o formas de administración que son, conforme a un buen juicio médico, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y de animales, sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones que impedirían una relación beneficio/riesgo razonable. Como se describe aquí en más detalladamente, los transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados para uso en la presente invención comprenden gases, líquidos y materiales semisólidos y sólidos.

[0054] Salvo si aquí se indica de otro modo, "sujeto" o "paciente" se usan como sinónimos, y se refieren a mamíferos, como, por ejemplo, pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales de experimentación como, por ejemplo, conejos, perros, gatos, ratas, ratones, y otros animales. Por ello, "sujeto" o "paciente", tal como aquí se usan, significa cualquier paciente o sujeto que es un mamífero y al que se pueden administrar las composiciones de la invención. En algunas realizaciones de la presente invención, el paciente estará padeciendo una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune. En algunas realizaciones de la presente invención, al paciente se le habrá diagnosticado cáncer. A fin de identificar pacientes candidatos a tratamiento con un anticuerpo o composición de la invención, se emplean métodos de análisis con los que determinar el estado de una enfermedad o problema de salud ya existente en un sujeto, o con los que determinar los factores de riesgo asociados a una enfermedad o problema de salud diana o sospechado. Dichos métodos de análisis incluyen, por ejemplo, exámenes para determinar si un sujeto padece una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria, cáncer o una enfermedad autoinmune. Esos y otros métodos rutinarios permiten que el médico seleccione sujetos que necesitan tratamiento.

[0055] "Tratar" se refiere a indicios de éxito con el tratamiento o a la mejoría de, por ejemplo, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria tal como una enfermedad inflamatoria mediada por GM-CSF, cáncer, o una enfermedad autoinmune, incluidos cualesquiera parámetros objetivos o subjetivos tales como: mitigación; remisión; aliviar los síntomas o hacer que la enfermedad o estado patológico resulte más tolerable para el paciente; ralentizar la velocidad de degeneración o de empeoramiento; o hacer que el punto final de la degeneración sea menos debilitante. El tratamiento o mejoría de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos, incluidos los resultados de exámenes o exploraciones. Por eso, el término "tratar" incluye la administración de los compuestos o sustancias de la presente invención a fin de retrasar, aliviar o detener o inhibir el desarrollo de los síntomas o estados patológicos asociados al cáncer, a una enfermedad infecciosa, a una enfermedad inflamatoria tal como una enfermedad inflamatoria mediada por GM-CSF, o a una enfermedad autoinmune. Tratar incluye, por ejemplo, inhibir el crecimiento de las células displásicas, inhibir la progresión del cáncer o de la enfermedad neoplásica, mantener

inhibido el crecimiento tumoral e inducir la remisión.

[0056] El término “compuesto terapéutico”, tal y como aquí se usa, se refiere a un compuesto útil en la profilaxis o en el tratamiento de una enfermedad o estado patológico, tales como cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune.

[0057] “Efecto terapéutico” se refiere a la reducción, eliminación o prevención de la enfermedad, de los síntomas de la enfermedad o de los efectos secundarios de la enfermedad en el sujeto. “Cantidad eficaz” se refiere a una cantidad necesaria para producir un efecto deseado. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad que, cuando se administra a un sujeto a fin de tratar una enfermedad, un estado patológico o un trastorno, es suficiente para efectuar el tratamiento destinado a esa enfermedad, estado patológico o trastorno.

[0058] “Administración concomitante”, “administración concurrente”, o “coadministración”, tal y como aquí se usan, son términos que comprenden la administración de las sustancias activas (por ejemplo, MAbs, sustancias quimioterápicas, biomoléculas), en conjunción o combinadas, juntas, o antes de o después de cada una de las mismas. Las múltiples sustancias pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes, simultánea o secuencialmente, siempre que se administren de una manera suficiente para dejar que todas dichas sustancias alcancen sus concentraciones eficaces en su lugar de acción. Los expertos en la materia no tendrían dificultad alguna para determinar el momento de administración, la secuencia de administración y las dosis/pautas posológicas adecuadas, de los fármacos y composiciones concretos de la presente invención.

[0059] El término “células donantes” se usa, en un sentido amplio, para referirse a células fusionadas con células B humanas a fin de generar hibridomas. Dichas células comprenden, entre otras posibles, células de mielomas de roedores, que conocen los expertos en la materia; líneas celulares de roedores, líneas celulares humanas; líneas celulares aviares. Las líneas celulares pueden obtenerse mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia.

[0060] “Inmunoglobulina” o “anticuerpo” se usa en un sentido amplio para referirse tanto a moléculas de anticuerpo como a una diversidad de moléculas derivadas de anticuerpos, y comprende todo miembro de un grupo de glicoproteínas que se dan en los mamíferos superiores y que son componentes primordiales del sistema inmunitario. El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio posible, y comprende, concretamente, anticuerpos monoclonales, composiciones a base de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, dímeros y moléculas de cadena única, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv), siempre que muestren la actividad biológica deseada. Una molécula de inmunoglobulina comprende dominios de unión a antígenos, y cada uno de dichos dominios comprende las cadenas ligeras y la porción del extremo terminal de la cadena pesada, así como la región Fc, que resulta necesaria para diversas funciones, tales como la fijación del complemento. Hay cinco clases de inmunoglobulinas, y la estructura primaria de la cadena pesada, a nivel de la región Fc, determina la clase de inmunoglobulina. Concretamente, las cadenas alfa, delta, épsilon, gamma, y mu se corresponden con la IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Tal y como aquí se usa, el término “inmunoglobulina” o “anticuerpo” se refiere a todas las subclases alfa, delta, épsilon, gamma y mu, y además, se refiere a todo multímero natural (por ejemplo, IgA e IgM) o multímero sintético que tenga la estructura de cuatro cadenas de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos se unen de manera específica, no covalente, y reversible, a un antígeno.

[0061] El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como aquí se usa, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, que cada uno de los anticuerpos que comprende la población es idéntico, salvo por las posibles mutaciones que se produzcan de manera natural y que pueden estar presentes en cantidades escasas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por un solo clon de células productoras de anticuerpos. A diferencia de los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales son monoespecíficos (por ejemplo, específicos de un solo epítipo de un solo antígeno). El adjetivo modificador “monoclonal” indica la naturaleza del anticuerpo: significa que ha sido obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos; y no se considera que haya una necesidad de producir dicho anticuerpo monoclonal mediante algún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de conformidad con la presente invención pueden producirse mediante el método del hibridoma que fue descrito por primera vez en Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495, 1975, o bien, pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Además, los “anticuerpos monoclonales” pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos, usando las técnicas que se describen en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, 1991, por ejemplo.

[0062] Tal y como aquí se usa, el término “quimerizada” se refiere a una inmunoglobulina en la que las regiones variables de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras no son de origen humano, y en la que las regiones constantes de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras sí son de origen humano.

[0063] “Humanizada” se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, en la que los aminoácidos implicados directamente en la unión a antígenos, las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras, no son de origen humano, mientras que el resto de la molécula de inmunoglobulina, las regiones de andamiaje (FWR o FR, por sus siglas en inglés) de las regiones

variables de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras, y las regiones constantes de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras, sí son de origen humano.

5 [0064] “Completamente humana” o “plenamente humana” se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, en la que toda la molécula es de origen humano; o bien, la molécula consta de una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la forma humana del anticuerpo.

10 [0065] “Epítopo” se refiere a un determinante inmunológico de un antígeno que sirve de sitio (lugar) de unión de un anticuerpo. Tal y como aquí se usa, el término “epítopo conformacional” se refiere a un epítopo discontinuo formado por una relación espacial entre los aminoácidos de un antígeno, diferente a una serie sucesiva de aminoácidos.

15 [0066] “Hibridoma” se refiere al producto de una fusión celular entre un linfocito neoplásico cultivado y un linfocito B o T cebado que expresa el potencial inmune específico de la célula parental.

20 [0067] “GM-CSF” se refiere a una familia de factores de crecimiento, que son glicoproteínas y que controlan la producción, la diferenciación y la función de los granulocitos y de los monocitos-macrófagos. Se pueden ver formas ejemplares (que no son, en modo alguno, la única forma de tales moléculas) de dichas moléculas en la patente estadounidense N.º 5.602.007 (34).

25 [0068] Tal y como aquí se usa, el término “biomolécula” se refiere a toda molécula que pueda conjugarse con, coadministrarse con, o administrarse antes o después de administrar un anticuerpo, o que pueda usarse de otro modo en asociación con un anticuerpo de la invención. Son biomoléculas, entre otras posibles, las siguientes: enzimas, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos, así como fragmentos, homólogos, análogos, derivados y combinaciones de lo anterior. Son ejemplos de biomoléculas, entre otros posibles, los siguientes: interleucina-2, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, rituxán, zevalín, herceptina, erbitux, y avastina. Las biomoléculas pueden ser nativas, recombinantes, o sintéticas (sintetizadas), y pueden modificarse, respecto de su forma nativa con, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, miristilaciones, y similares. El término “biomolécula”, tal y como aquí se usa, no está limitado a las moléculas que se dan en la naturaleza, e incluye las moléculas sintéticas de origen no biológico.

35 [0069] Los polipéptidos conformes con la presente invención pueden sintetizarse a partir de aminoácidos, mediante técnicas conocidas por los expertos en materia de polipéptidos. En general, dichos métodos comprenden la adición secuencial de uno o más residuos de aminoácidos, o residuos de aminoácidos adecuadamente protegidos, a una cadena peptídica en crecimiento. Normalmente, el grupo amino o el grupo carboxilo del primer residuo de aminoácido se protege mediante un grupo protector adecuado, que se puede retirar selectivamente. Para los aminoácidos que contienen un grupo lateral reactivo diferente (por ejemplo, lisina), se utiliza un grupo protector retirable selectivamente diferente.

40 [0070] Son conocidos, en el estado de la técnica, diversos métodos para la preparación de los polipéptidos de la presente invención (WO 89/06657; WO 92/22315; WO 98/49191; patentes estadounidenses N.º 5.260.273, 5.164.369, 5.407.914, 5.789.381, 5.952.303, 6.013.619, 6.013.764, 6.120.795 y 6.613.734).

45 [0071] Se pueden añadir residuos adicionales en cualquiera de los extremos terminales de un polipéptido de la presente invención; por ejemplo, con la finalidad de proporcionar un “enlazador” mediante el que pueda fijarse con facilidad dicho polipéptido a un marcador, a una matriz sólida o a un transportador. Los marcadores, las matrices sólidas y los transportadores que se pueden usar con los polipéptidos de esta invención son conocidos en el estado de la técnica; en la presente invención se describen también algunos ejemplos.

50 [0072] Los enlazadores de residuos de aminoácidos suelen comprender al menos un residuo, y pueden comprender 40 o más residuos; más frecuentemente, comprenden de 1 a 10 residuos. Los residuos de aminoácidos que se usan habitualmente para el enlazado son tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, o similares. Además, una secuencia de polipéptidos conforme a esta invención puede diferir de la secuencia natural en el hecho de que la secuencia se modifique mediante una acilación NH₂-terminal, o acetilación, o amidación con ácido tioglicólico, o una amidación carboxiterminal (por ejemplo, con amoníaco, metilamina) y similares.

60 [0073] Si bien en esta invención se presentan, en relación con las moléculas y composiciones de dicha invención, muchos polipéptidos útiles, como, por ejemplo, los de las SEC N.º ID: 1-5, es cierto también que hay una amplia diversidad de otras moléculas, incluidos aminoácidos poco comunes pero que se dan en la naturaleza, así como metabolitos y catabolitos de aminoácidos naturales, aminoácidos sustituidos, análogos de aminoácidos, y aminoácidos en la configuración “D”, que resultan útiles en las moléculas y composiciones de la invención. Además, los derivados, análogos y miméticos de aminoácidos, “diseñados”, resultan también útiles en diversos compuestos y composiciones de la presente invención, como lo son, asimismo, los polímeros que incluyen estructuras de esqueleto químico compuestas de uniones no amídicas.

65 [0074] Se debe entender que los términos “análogos” y “derivados” de polipéptidos y de residuos de

aminoácidos, tal y como aquí se usan, engloban a los metabolitos y catabolitos de aminoácidos, así como a moléculas que incluyen uniones, esqueletos químicos y cadenas laterales o grupos laterales que difieren de los que se encuentran habitualmente en lo que se denominan los aminoácidos de configuración L “que se dan en la naturaleza” (además, los términos “análogo” y “derivado” pueden usarse, en el contexto de esta invención, como sinónimos, cuando resulte adecuado). Por lo tanto, las moléculas de D-aminoácidos, las moléculas que mimetizan aminoácidos y los aminoácidos con cadenas laterales “diseñadas”, (es decir, que pueden sustituir a uno o más aminoácidos en una molécula que tiene actividad surfactante), deben considerarse también englobados, en el contexto de esta invención, por los términos “análogos” y “derivados”.

[0075] Por ejemplo, además de los R-aminoácidos que se enumeran en la Tabla 1, los metabolitos de aminoácidos, tales como homoarginina, citrulina, ornitina y ácido α -aminobutanoico, son también útiles en las moléculas y composiciones de la presente invención.

[0076] En otra variación, puede desearse construir una molécula que adopte una conformación más “rígida”; una manera de lograrlo sería añadir metilo u otros grupos al átomo de carbono α de los aminoácidos.

[0077] Además, son útiles los aminoácidos sustituidos que, por lo general no se obtienen de las proteínas, pero que se sabe que existen en la naturaleza, de la manera descrita en la presente invención; los siguientes son algunos ejemplos: L-canavanina; 1-metil-L-histidina; 3-metil-L-histidina; 2-metil L-histidina; ácido α,ϵ -diaminopimélico (forma L, forma meso o ambas formas); sarcosina; betaína de L-ornitina; betaína de histidina (hercinina); L-citrulina; L-fosfoarginina; D-octopina; o-carbamil-D-serina; ácido γ -aminobutanoico; y β -lisina. Los D-aminoácidos y los análogos de D-aminoácidos (entre ellos, los que citan a continuación) son también útiles en las proteínas, los péptidos y las composiciones de la presente invención: D-alanina, D-serina, D-valina, D-leucina, D-isoleucina, D-aloisoleucina, D-fenilalanina, ácido D-glutámico, D-prolina, D-alohidroxiprolina y similares. Lo antedicho puede también usarse en los polipéptidos GM-CSF.

[0078] Los aminoácidos pueden comprender análogos, metabolitos, catabolitos y derivados, con independencia del momento o la ubicación en que se produzca la modificación. Básicamente, los aminoácidos modificados pueden clasificarse en tres categorías: (1) catabolitos y metabolitos de aminoácidos; (2) aminoácidos modificados generados mediante modificación postraducciona (por ejemplo, modificación de cadenas laterales); y (3) modificaciones efectuadas a aminoácidos, mediante procesos no metabólicos o no catabólicos (por ejemplo, síntesis de aminoácidos modificados o derivados, en el laboratorio).

[0079] Se pueden diseñar fácilmente cadenas laterales de los aminoácidos de las unidades de residuo, de manera que incluyan cadenas laterales más largas o más cortas, mediante la adición o la sustracción de grupos metileno, en disposiciones de cadena lineal, cadena ramificada, o de anillo hidrocarbonado o heterocíclico. Además, las estructuras en forma de cadena lineal o cadena ramificada pueden contener átomos que no sean carbono, tales como S, O o N. Los ácidos grasos también pueden ser constituyentes útiles de las moléculas surfactantes que se describen en la presente invención. Las cadenas laterales diseñadas pueden terminar en extremos (R') o (R) con o sin grupos cargados o polares.

[0080] También son útiles los análogos, que comprenden moléculas que se derivan del uso de diferentes enlazadores. También son útiles, tal y como se describe esta invención, las moléculas con cadenas laterales unidas entre sí mediante uniones que no sean uniones amida; por ejemplo, moléculas que contengan cadenas laterales de aminoácido u otras cadenas laterales (R- o R'-), si los componentes están unidos mediante uniones carboxi, fosfoéster, etileno, metileno, cetona u otras uniones, por poner unos pocos ejemplos. Básicamente, toda molécula que contenga una cadena lateral de aminoácido, un grupo R o un grupo R', puede ser útil conforme a lo que aquí se describe.

[0081] El anticuerpo de la presente invención puede estar en forma de un dímero unido por un enlazador adecuado; por ejemplo, dímeros de péptidos unidos por moléculas de cisteína. (Como saben los expertos en la materia, dos moléculas de cisteína pueden unirse entre sí mediante un puente disulfuro formado mediante oxidación de sus grupos tiol). Tales enlazadores o puentes pueden conformar enlaces cruzados entre diferentes cadenas de polipéptidos, dímeros, trímeros y similares. Otros enlazadores útiles que se pueden usar para conectar dímeros de péptidos y/u otros multímeros de péptidos comprenden los que se han enumerado anteriormente, como, por ejemplo, uniones carboxi, fosfo-éster, etileno, metileno, cetona u otras uniones, y similares.

[0082] Los expertos en la materia comprenderán que se puede efectuar una diversidad de modificaciones a aminoácidos individuales, a las uniones, y/o a la cadena en sí, y que dichas modificaciones producirán moléculas que recaen dentro del ámbito de la presente invención, siempre que las moléculas resultantes tengan la actividad biológica (por ejemplo, antigénica) descrita en esta invención.

[0085] En esta invención se emplearon métodos notificados con anterioridad a la misma, para la generación de hibridomas que secretan MAbs humanos (WO2004/046330), mediante el uso de células B primarias humanas. Se inmunizan *ex vivo* PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) –preferiblemente, PBMCs humanas–, en presencia del antígeno diana; después, se immortalizan dichas células

inmunizadas, mediante fusión celular con células donantes. Otra opción consiste en identificar PBMCs seleccionadas cuyos sueros presentan una reactividad inmune (inmunorreactividad) alta contra el antígeno de interés.

5 [0086] Se analizan células híbridas derivadas de las células donantes y se seleccionan las que secretan MAbs específicos del antígeno diana. En algunas realizaciones se proporcionan métodos para la producción de células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales contra un antígeno diana, a partir de células inmunizadas *ex vivo*, productoras de inmunoglobulinas; dichos métodos comprenden: (a) combinar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) que comprenden células productoras de inmunoglobulinas, con un antígeno diana, *ex vivo*; (b) fusionar las células productoras de inmunoglobulinas con células donantes, a fin de formar células de hibridoma; (c) determinar la unión al antígeno de los anticuerpos producidos a partir de las células de hibridoma; y (d) seleccionar las células de hibridoma que producen anticuerpos que se unen al antígeno diana; con lo cual, se generan células de hibridoma que producen anticuerpos contra el antígeno diana. Las PBMCs pueden proceder de donantes sanos. Preferiblemente, el antígeno diana es GM-CSF, y más preferiblemente, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una de las SEC N.º ID: 35-38.

20 [0087] En otra opción, los métodos para la generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que tienen como diana un antígeno asociado a una enfermedad o a enfermedades, comprenden los siguientes pasos: (a) fusionar *ex vivo* células mononucleares de sangre periférica que comprenden células B productoras de inmunoglobulinas obtenidas de un paciente que tiene una enfermedad o de un donante expuesto a un antígeno, con células donantes, a fin de formar células de hibridoma; (b) determinar la unión de los anticuerpos producidos a partir de las células de hibridoma, al antígeno diana; y (c) seleccionar las células de hibridoma que producen anticuerpos que se unen al antígeno diana; con lo cual, se producen células de hibridoma que expresan anticuerpos contra el antígeno diana. Preferiblemente, el antígeno diana es un antígeno asociado a una enfermedad o a enfermedades, y preferiblemente está asociado a cáncer, a una enfermedad infecciosa o a una enfermedad autoinmune. Más preferiblemente, el antígeno asociado a enfermedades es GM-CSF. Preferiblemente, el antígeno diana es GM-CSF y, más preferiblemente, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una de las SEC N.º ID: 35-38. En una realización preferida, el donante expuesto a antígeno ha sido expuesto al GM-CSF o puede tener proteinosis alveolar pulmonar (PAP).

35 [0088] La invención proporciona métodos para la producción de células de hibridoma que producen anticuerpos contra el antígeno diana (GM-CSF o péptidos antigénicos del mismo), a partir de células inmunizadas *ex vivo* productoras de inmunoglobulinas; dichos métodos comprenden: (a) combinar células mononucleares de sangre periférica que comprenden células productoras de inmunoglobulinas con un antígeno diana, *ex vivo*; (b) fusionar las células productoras de inmunoglobulinas con células donantes, a fin de formar células de hibridoma; (c) analizar la unión de las inmunoglobulinas producidas por las células de hibridoma y seleccionar las células que producen inmunoglobulinas que se unen al antígeno diana; con lo cual, se producen células de hibridoma que producen anticuerpos contra el antígeno diana. Las PBMCs pueden proceder de donantes sanos. El antígeno diana puede comprender un polipéptido antigénico. Preferiblemente, el antígeno diana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una de las SEC N.º ID: 1-5 y, preferiblemente, una de las SEC N.º ID: 3-5.

45 [0089] En otra opción, la invención proporciona métodos para la producción de células de hibridoma que producen anticuerpos contra un antígeno diana (por ejemplo, GM-CSF o péptidos antigénicos del mismo), y dichos métodos comprenden: (a) seleccionar células mononucleares de sangre periférica que comprenden células productoras de inmunoglobulinas procedentes de un donante expuesto a antígeno; (b) fusionar las células productoras de inmunoglobulinas con células de mieloma a fin de formar células de hibridoma; (c) analizar la unión de las inmunoglobulinas producidas por las células de hibridoma y seleccionar las células que producen inmunoglobulinas que se unen al antígeno diana; con lo cual, se producen células de hibridoma que producen anticuerpos contra el antígeno diana. El antígeno diana puede comprender un polipéptido antigénico conforme a la invención. Preferiblemente, el antígeno diana comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una de las SEC N.º ID: 1-5 y, más preferiblemente, una de las SEC N.º ID: 3-5. El donante puede haber sido expuesto al GM-CSF, o a péptidos antigénicos del mismo, o puede tener proteinosis alveolar pulmonar (PAP).

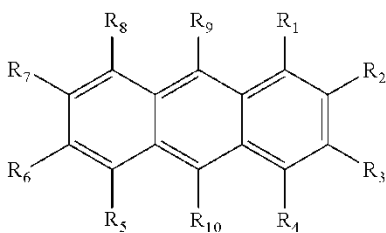
55 [0090] Las células donantes (por ejemplo, de mieloma) pueden expresar un inhibidor proteico de la reparación de discordancias. Las células de hibridoma pueden expresar un inhibidor proteico de la reparación de discordancias. El inhibidor proteico de la reparación de discordancias puede introducirse en la célula de hibridoma después de la fusión de las células de mieloma con las células productoras de inmunoglobulinas. El inhibidor proteico de la reparación de discordancias puede introducirse en la célula donante o de mieloma antes de la fusión con las células productoras de inmunoglobulinas. Las células donantes o de mieloma o las células productoras de inmunoglobulinas pueden ser deficientes, de manera natural, en reparación de discordancias.

65 [0091] Los inhibidores proteínicos de la reparación de discordancias comprenden alelos dominantes negativos de genes de reparación de discordancias. Son alelos dominantes negativos de genes de reparación de discordancias, entre otros, los alelos dominantes negativos de los genes PMS2, PMS1, PMSR3, PMSR2, PMSR6, MLH1, GTBP, MSH3, MSH2, MLH3 o MSH1, y homólogos de los genes mutL y mutS. Además, pueden usarse

polipéptidos capaces de interferir con la reparación de discordancias. Por ejemplo, un alelo dominante negativo de mutL PMS2 comprende los primeros 133 aminoácidos de PMS2. La delineación adicional de los aminoácidos presentes en los homólogos de mutL revela los aminoácidos

LSTAVKELVENS LDAGATNIDLKLDYGVDLIEVSDNGCGVEEENFE (SEC N.º ID: 6) y LRQVLSNLLDNAIKYTPEGGEITVSLERDGDHLEITVEDNGPGIPEEDLE (SEC N.º ID: 7), o fragmentos de los mismos. Por lo tanto, los inhibidores proteínicos de la reparación de discordancias comprenden los polipéptidos de las SEC N.º ID: 6 y 7, y fragmentos de los mismos. El inhibidor proteico de la reparación de discordancias puede inactivarse antes o después de la identificación de una célula de hibridoma que genera anticuerpos monoclonales contra el antígeno diana. La inactivación del inhibidor proteico de la reparación de discordancias puede efectuarse por cualquiera de los medios conocidos en este campo del conocimiento; por ejemplo, retirada de un inductor o retirada, de la célula, del inhibidor proteico de la reparación de discordancias (es decir, "curar" a la célula del inhibidor proteico de la reparación de discordancias). La inactivación del inhibidor de la reparación de discordancias estabiliza el genoma del hibridoma hipermutado.

[0092] En algunos métodos de generación de células de hibridoma, las células de hibridoma son expuestas a un inhibidor químico de la reparación de discordancias. Los inhibidores químicos de la reparación de discordancias que se usan en ciertas realizaciones de los métodos comprenden, al menos, uno de los siguientes elementos: un antraceno, un inhibidor de la ATPasa, un inhibidor de la nucleasa, una molécula de interferencia del ARN, un inhibidor de la polimerasa, un oligonucleótido "antisense" que se hibrida específicamente con un nucleótido que codifica una proteína de reparación de discordancias (WO2004/046330). El inhibidor químico puede ser un compuesto antracénico que tenga la fórmula:



en donde cada uno de los radicales R₁-R₁₀ son, de manera independiente entre sí: hidrógeno, hidroxilo, amino, alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, O-alquilo, S-alquilo, N-alquilo, O-alquenoilo, S-alquenoilo, N-alquenoilo, O-alquinoilo, S-alquinoilo, N-alquinoilo, arilo, arilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, aralquilo, arilalquilo, alquilarilo, alquilariloxi, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, alcóxicarbonilo, arilalcóxicarbonilo, guanidino, carboxi, un alcohol, un aminoácido, sulfonato, alquilsulfonato, CN, NO₂, un grupo aldehído, un éster, un éter, un éter corona, una cetona, un compuesto organosulfurado, un grupo organometálico, un ácido carboxílico, una organosilicona o un carbohidrato que opcionalmente contiene uno o más grupos hidroxilo alquilados; y en donde dichos heteroalquilo, heteroarilo, y heteroarilo sustituido contienen al menos un heteroátomo que es oxígeno, azufre, un átomo metálico, fósforo, silicio o nitrógeno; y en donde dichos sustituyentes de dichos alquilo sustituido, alquenoilo sustituido, alquinoilo sustituido, arilo sustituido y heteroarilo sustituido son un elemento halógeno, CN, NO₂, alquilo de peso molecular bajo, arilo, heteroarilo, aralquilo, aralcoxi, guanidino, alcóxicarbonilo, alcoxi, hidroxilo, carboxi y amino; y en donde dichos grupos amino son opcionalmente sustituidos con un grupo acilo o con de 1 a 3 grupos arilo o grupos alquilo de peso molecular bajo. En ciertas realizaciones, R₅ y R₆ son hidrógeno. En otras realizaciones, R₁-R₁₀ son, de manera independiente entre sí, hidrógeno, hidroxilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, fenilo, toliilo, hidroximetilo, hidroxipropilo, o hidroxibutilo. Son ejemplos de antracenos, entre otros posibles, los siguientes: 1,2-dimetilantraceno, 9,10-dimetilantraceno, 7,8-dimetilantraceno, 9,10-difenilantraceno, 9,10-dihidroximetilantraceno, 9-hidroximetil-10-metilanttraceno, dimetilanttraceno-1,2-diol, 9-hidroximetil-10-metilanttraceno-1,2-diol, 9-hidroximetil-10-metilanttraceno-3,4-diol y 9,10-di-*m*-tolilantraceno.

[0093] El inhibidor químico puede introducirse en el medio de crecimiento (medio de cultivo) de las células. El inhibidor químico puede ser retirado de las células de hibridoma hipermutadas a fin de re-estabilizar el genoma de dichas células. En otra opción, el método comprende la inactivación del inhibidor químico de la reparación de discordancias, con lo que se estabiliza el genoma del hibridoma hipermutado.

[0094] Además, los métodos pueden comprender clonar los genes productores de inmunoglobulinas de las células productoras de inmunoglobulinas y transfectar los genes de inmunoglobulinas en una célula de expresión de mamífero, en la que los genes de inmunoglobulinas se unen operativamente a secuencias de control de la expresión.

[0095] La invención proporciona asimismo métodos para producir células de expresión de mamífero que producen anticuerpos de alta afinidad contra el antígeno diana, a partir de células, inmunizadas *ex vivo*, productoras

de inmunoglobulinas, y dichos métodos comprenden: (a) combinar células mononucleares de sangre periférica que comprenden células productoras de inmunoglobulinas, con un antígeno diana, *ex vivo*; (b) fusionar las células productoras de inmunoglobulinas con células donantes a fin de formar células de hibridoma; (c) determinar la unión al antígeno de los anticuerpos producidos a partir de las células de hibridoma; (d) optimizar la producción de anticuerpos del hibridoma mediante inhibición de la reparación de discordancias; o clonar genes de inmunoglobulinas del hibridoma en una célula de expresión de mamífero, y se inhibe la reparación de discordancias en dicha célula de expresión de mamífero; y (e) seleccionar las células de hibridoma que producen anticuerpos que se unen al antígeno diana; con lo cual, se generan células de hibridoma que producen anticuerpos contra el antígeno diana. Como alternativa a los pasos (a) y (b), puede emplearse fusión *ex vivo* de las células mononucleares de sangre periférica que comprenden células B productoras de inmunoglobulinas obtenidas de un paciente que tiene una enfermedad o de un donante expuesto al antígeno, con células donantes, a fin de formar células de hibridoma.

[0096] La invención proporciona asimismo métodos para producir células de expresión de mamífero que producen anticuerpos de alta afinidad contra el antígeno diana, a partir de células, inmunizadas *ex vivo*, productoras de inmunoglobulinas, y dichos métodos comprenden: (a) combinar células mononucleares de sangre periférica que comprenden células productoras de inmunoglobulinas con un antígeno diana *ex vivo*; (b) fusionar las células productoras de inmunoglobulinas con células de mieloma, a fin de formar células de hibridoma; (c) analizar la unión de los anticuerpos producidos por dichas células de hibridoma al antígeno diana; (d) optimizar la producción del hibridoma mediante inhibición de la reparación de discordancias; o clonar genes de inmunoglobulinas del hibridoma en una célula de expresión de mamífero, y se inhibe la reparación de discordancias en dicha célula de expresión de mamífero; y (e) identificar y seleccionar las células de expresión de mamífero que secretan anticuerpos con mayor afinidad de unión por el antígeno diana que los anticuerpos producidos por las células de hibridoma o células recombinantes.

[0097] En la presente invención se presenta asimismo un método de producción de células de expresión de mamífero que produce niveles altos de anticuerpos de alta afinidad, a partir de células, inmunizadas *ex vivo*, productoras de inmunoglobulinas, y dicho método comprende: (a) combinar células mononucleares de sangre periférica que comprenden células productoras de inmunoglobulinas, con un antígeno diana, *ex vivo*; (b) fusionar las células productoras de inmunoglobulinas con células donantes, a fin de formar células de hibridoma; (c) determinar la unión al antígeno de los anticuerpos producidos a partir de las células de hibridoma; (d) clonar genes de inmunoglobulinas del hibridoma en una célula de expresión de mamífero parental, y se inhibe la reparación de discordancias en dicha célula de expresión de mamífero; (e) incubar la célula de expresión de mamífero o de hibridoma parental, a fin de permitir la mutagénesis, con lo que se forman células de expresión de mamífero hipermutadas; (f) seleccionar las células de expresión de mamífero hipermutables que secretan anticuerpos con una mayor afinidad de unión por el antígeno diana, en comparación con los anticuerpos producidos a partir de las células de hibridoma parentales, o seleccionar las células de expresión de mamífero hipermutables que secretan niveles más altos de anticuerpos que las células de expresión de mamífero parentales; con lo que se producen células de expresión de mamífero que producen anticuerpos contra el antígeno diana, a partir de células, inmunizadas *ex vivo*, productoras de inmunoglobulinas. Como alternativa a los pasos (a) y (b), puede emplearse fusión *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica que comprenden células B productoras de inmunoglobulinas obtenidas de un paciente que tiene una enfermedad o de un donante expuesto al antígeno, con células donantes, a fin de formar células de hibridoma.

[0098] En la presente invención se presenta asimismo un método de producción de células de expresión de mamífero que produce niveles altos de anticuerpos de alta afinidad, a partir de células, inmunizadas *ex vivo*, productoras de inmunoglobulinas, y dicho método comprende: (a) combinar células mononucleares de sangre periférica que comprenden células productoras de inmunoglobulinas con un antígeno diana *ex vivo*; (b) fusionar las células productoras de inmunoglobulinas con células de mieloma, a fin de formar células de hibridoma; (c) analizar la unión de los anticuerpos producidos por las células de hibridoma y seleccionar las células que producen anticuerpos que se unen al antígeno; (d) clonar genes de inmunoglobulinas del hibridoma en una célula de expresión de mamífero parental, y se inhibe la reparación de discordancias en dicha célula de expresión de mamífero, u optimizar la producción del hibridoma mediante inhibición de la reparación de discordancias; (e) incubar la célula de expresión de mamífero o de hibridoma parental, a fin de permitir la mutagénesis, con lo que se forman células de expresión de mamífero hipermutadas; (f) identificar y seleccionar las células de expresión de mamífero hipermutables que secretan anticuerpos con una mayor afinidad de unión por el antígeno diana, en comparación con los anticuerpos producidos a partir de las células de hibridoma; y (g) identificar y seleccionar las células de expresión de mamífero hipermutables que secretan niveles más altos de anticuerpos que las células de expresión de mamífero parentales; con lo que se producen células de expresión de mamífero que producen niveles más altos de anticuerpos de alta afinidad, a partir de células, inmunizadas *ex vivo*, productoras de inmunoglobulinas.

[0099] En algunas realizaciones del método, los anticuerpos se seleccionan usando un ensayo basado en ELISA, o usando otros ensayos capaces de medir la unión anticuerpo-antígeno, conocidos en este campo del conocimiento. Crowther, J. R. (2001) The ELISA guidebook, 1st ed. Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, Estados Unidos.

[0100] En los ensayos de selección se pueden seleccionar hibridomas hipermutados que producen anticuerpos

de mayor afinidad que los producidos por los hibridomas parentales.

[0101] El método del método puede comprender, además, seleccionar células productoras de anticuerpos hipermutadas que tengan mayores niveles de anticuerpos que los producidos por las células seleccionadas originalmente.

[0102] Los métodos de fusión de células productoras de anticuerpos con células de mieloma, así como las células de mieloma útiles en tales métodos, son también conocidos en este campo del conocimiento. Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.* 1976, 6:511-9. *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion.*

[0103] Las células B humanas empleadas para la generación de los MAbs concebidos para su administración a seres humanos podrían constituir un posible vehículo de transmisión de virus. Se pueden analizar previamente (por ejemplo, mediante PCR [reacción en cadena de la polimerasa]) las células "socias de fusión" (dos tipos de células que se fusionan), así como las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los donantes, a fin de confirmar la ausencia de ADN vírico, tal como, entre otros posibles, ADN de virus de la inmunodeficiencia 1 y 2, de virus de la hepatitis B y C, de citomegalovirus, de herpesvirus 6 y de virus de Epstein-Barr.

[0105] La invención comprende también los anticuerpos, contra antígenos diana, producidos por las células de hibridoma generadas conforme a los métodos que aquí se presentan. Los anticuerpos de la invención comprenden también los anticuerpos producidos recombinantemente usando los polinucleótidos de la invención. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales plenamente humanos.

[0106] Los anticuerpos preferidos de la invención se unen de manera específica a un epítipo, como por ejemplo un epítipo conformacional, de un antígeno diana. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención tienen como diana un antígeno asociado a enfermedades, como, por ejemplo, entre otros posibles, el GM-CSF. Las células productoras de anticuerpos se registraron en la Colección estadounidense de cultivos celulares (Amer. Type Cult. Coll., 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos) el 18 de enero de 2007 (10G9), y el 2 de febrero de 2007 (E10), y tienen asignados los números de acceso PTA-8173 y PTA-8193, respectivamente. Los ejemplos de anticuerpos anti-GM-CSF de la invención son anticuerpos producidos por dichas células.

[0107] Los expertos en la materia sabrán que la especificidad de los anticuerpos está determinada principalmente por las seis regiones CDR; en especial, por la CDR3 de la cadena pesada (cadena H) (Kala *et al.* (2002) *J. Biochem.* 132:535-41; Morea V *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 275:269-94; y Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-17). No obstante, las regiones de andamiaje ("framework", o FWR por sus siglas) de los anticuerpos pueden jugar un papel en las interacciones antígeno-anticuerpo (Panka DJ *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:3080-4), en particular en lo referente a su papel en la conformación de los bucles CDR (Foote J *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-99). Por ello, los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier combinación de regiones CDR o FWR de cadena H (pesada) o de cadena L (ligera) que confiera especificidad por el GM-CSF. Pueden emplearse experimentos de intercambio ("shuffling") de dominios, que se llevan a cabo rutinariamente en este campo del conocimiento (Jirholt P *et al.* (1998) *Gene* 215:471-6; Söderlind E *et al.* (2000) *Nature Biotechnology* 18:852-6), para, en el caso de la presente invención, generar anticuerpos que se unan de manera específica al GM-CSF, de conformidad con las especificaciones que aquí se describen y ejemplifican. Los anticuerpos generados mediante experimentos de intercambio de dominios recaen dentro del ámbito de la presente invención.

[0110] Se debe entender que, a causa de la variación natural de las secuencias que es probable que exista en las cadenas pesadas y ligeras y en los genes que las codifican, los expertos en la materia esperarían encontrar algún grado de variación en las secuencias de aminoácidos o en los genes que las codifican, aunque siempre manteniendo las propiedades de fijación únicas (a saber, especificidad y afinidad) de los anticuerpos de la presente invención. Tal expectativa se debe en parte a que se sabe que el código genético, de manera natural, sufre degeneración; también se debe al conocido éxito evolutivo de las variaciones conservadoras en las secuencias de aminoácidos, que no alteran de manera apreciable la naturaleza de la proteína codificada. Por lo tanto, dichas variantes y dichos homólogos se consideran sustancialmente iguales entre sí, y se incluyen dentro del ámbito de la presente invención.

[0111] Por eso, los anticuerpos de la presente invención comprenden variantes que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de uno o más aminoácidos, y que conservan las propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad de unión o actividad efectora inmune) de los anticuerpos de la invención. Los expertos en la materia pueden producir variantes que tengan sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de uno o más aminoácidos. Dichas variantes puede comprender, entre otras posibilidades: (a) variantes en las que uno o más residuos de aminoácidos sean sustituidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añadan uno o más aminoácidos al polipéptido o se eliminen ("deleciones") del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyan un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que el polipéptido se fusione con otro péptido o polipéptido tal como un socio de fusión, un marcador de una proteína u otra fracción química, que pueda conferir propiedades útiles al polipéptido, como, por ejemplo un epítipo para un anticuerpo, una secuencia

polihistidina, una fracción biotina, y similares. Los anticuerpos de la invención pueden comprender variantes en las que residuos de aminoácidos de una especie sean sustituidos con el residuo correspondiente en otra especie, en posiciones conservadas o no conservadas. En otras realizaciones, los residuos de aminoácidos situados en posiciones no conservadas son sustituidos con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas de obtención de dichas variantes, incluidas las técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, son conocidas por los expertos en la materia.

[0112] Los expertos en la materia sabrán que, en algunos casos, el emparejamiento de una cadena pesada (cadena "H", por la inicial del término "pesada" (*heavy*) en inglés) dada con diversas cadenas ligeras, o el emparejamiento de una cadena ligera (cadena "L", por la inicial del término "ligera" (*light*) en inglés) dada con diversas cadenas pesadas, produce anticuerpos con la misma o mayor especificidad y/o afinidad que la combinación nativa. Teniendo eso en cuenta, la presente invención no se limita a las combinaciones preferidas de parejas de cadenas H y L, y por ello, los anticuerpos de la invención engloban diferentes combinaciones de parejas de cadenas H y L, como, entre otras posibles, las cadenas H y L aquí descritas, u otras cadenas H y L que conocerían los expertos en la materia, o cualesquiera otras cadenas H y L que se determine experimentalmente que son compatibles con las cadenas H y L aquí descritas, a fin de obtener uniones específicas, de alta afinidad, al GM-CSF.

[0113] Los anticuerpos preferidos de la invención comprenden dos cadenas pesadas. Los anticuerpos preferidos de la invención comprenden dos cadenas ligeras. Más preferidos son los anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de la invención.

[0114] Los anticuerpos de la presente invención comprenden variantes que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de uno o más aminoácidos, y que conservan las propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad de unión, o actividad efectora inmune) de los anticuerpos de la invención. Los expertos en la materia pueden producir variantes que tengan sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de uno o más aminoácidos. Dichas variantes puede comprender, entre otras posibilidades: (a) variantes en las que uno o más residuos de aminoácidos sean sustituidos con aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añadan uno o más aminoácidos al polipéptido o se eliminen ("deleciones") del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyan un grupo sustituyente, y (d) variantes en las que el polipéptido se fusione con otro péptido o polipéptido tal como un socio de fusión, un marcador de una proteína, u otra fracción química, que pueda conferir propiedades útiles al polipéptido, como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una secuencia polihistidina, una fracción biotina y similares. Los anticuerpos de la invención pueden comprender variantes en las que residuos de aminoácidos de una especie sean sustituidos con el residuo correspondiente en otra especie, en posiciones conservadas o no conservadas. En otra realización, los residuos de aminoácidos situados en posiciones no conservadas son sustituidos con residuos conservadores o no conservadores. Las técnicas de obtención de dichas variantes, incluidas las técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, son conocidas por los expertos en la materia. Los anticuerpos de la invención comprenden también los fragmentos de anticuerpos. El término "fragmento" se refiere a secuencias polipeptídicas que tienen una longitud, preferiblemente, de al menos unos 40 aminoácidos; más preferiblemente, de al menos hasta unos 50 aminoácidos; más preferiblemente, de al menos unos 60 aminoácidos; más preferiblemente, de al menos unos 70 aminoácidos; más preferiblemente, de al menos unos 80 aminoácidos; más preferiblemente, de al menos unos 90 aminoácidos; y más preferiblemente, de al menos unos 100 aminoácidos; además, dichas secuencias polipeptídicas conservan parte de la actividad biológica o actividad inmunológica de la secuencia completa ("de longitud completa"), como, por ejemplo, la afinidad o avidez de unión y la actividad efectora inmune.

[0115] Los anticuerpos de la invención tienen afinidades de unión, por el antígeno diana, que incluyen una constante de disociación (K_D) inferior a 10^{-10} . En una realización, la K_D es inferior a 1×10^{-11} . En algunas realizaciones, la K_D es inferior a 1×10^{-12} . En otras realizaciones, la K_D es inferior a 1×10^{-13} . En otras realizaciones, la K_D es inferior a 1×10^{-14} . Y en otras realizaciones, la K_D es inferior a 1×10^{-15} .

[0116] Los anticuerpos de la invención comprenden derivados modificados, por ejemplo, por la unión covalente de algún tipo de molécula con el anticuerpo, de manera tal que la unión covalente no impide que el anticuerpo se una al epítipo que tiene como diana. Son ejemplos de derivados adecuados, entre otros posibles, los siguientes: anticuerpos y fragmentos glicosilados, anticuerpos y fragmentos acetilados, anticuerpos y fragmentos pegilados, anticuerpos y fragmentos fosforilados, y anticuerpos y fragmentos amidados. Los propios anticuerpos de la invención pueden ser derivados por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otras proteínas, y similares. Además, los anticuerpos de la invención pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos, como se ha descrito aquí anteriormente. En algunas realizaciones de la invención, el GM-CSF, o epítopos del mismo, se conjugan con una proteína inmunogénica, a fin de aumentar la inmunogenicidad del antígeno. La proteína inmunogénica puede ser cualquier proteína que aumente la respuesta inmune de las células; por ejemplo, entre otras posibilidades, puede ser: toxoide tetánico C (TT), hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), albúmina, ovoalbúmina, albúmina de embrión de pollo (CAB, por sus siglas en inglés), seroalbúmina bovina, tiroglobulina, toxoide diftérico, BCG (bacilo de Calmette-Guérin), toxina del cólera y similares. En algunas realizaciones, el antígeno se genera mediante desnaturalización de la proteína madura.

[0117] Los anticuerpos de la invención pueden tener fracciones postraduccionales que aumentan la actividad o la

estabilidad de dichos anticuerpos. Dichas fracciones pueden ser, entre otras posibles, fracciones sulfuro, metilo, carbohidrato, fósforo, así como otros grupos químicos que se encuentran frecuentemente en las moléculas de inmunoglobulina.

5 [0118] Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier isotipo, y el isotipo del anticuerpo puede cambiarse mediante cambio de clase (cambio isotópico) *in vivo* o mediante ingeniería genética.

10 [0119] En la presente especificación se describen secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención comprenden (entre otras posibilidades) ADN genómico, ADN, ADNc, ARN, ácidos nucleicos de cadena doble y de cadena única, así como secuencias complementarias de lo anterior.

15 [0122] En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la invención (y los péptidos que codifican) comprenden una secuencia líder. Puede emplearse cualquier secuencia líder conocida en este campo del conocimiento. La secuencia líder puede incluir, entre otras posibilidades, un sitio de restricción y/o un sitio de inicio de la traducción.

[0123] También se describen en la presente invención vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos que codifican los anticuerpos de la invención, y además, células host como, por ejemplo, células host recombinantes, que expresan los polinucleótidos.

20 [0124] La invención proporciona los vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales (como, entre otras posibles, secuencias reguladoras [por ejemplo, un promotor, un mejorador]), un marcador de selección y una señal de poliadenilación.

25 [0125] Los vectores de expresión recombinantes comprenden fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, genómicos o derivados de ADNc, que codifican al menos una proteína recombinante que puede unirse, operativamente, a elementos reguladores adecuados. Dichos elementos reguladores pueden comprender un promotor de la transcripción, secuencias que codifican sitios de unión ribosómicos a ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y de la traducción. Los vectores de expresión, en especial los vectores de expresión de mamíferos, pueden comprender asimismo uno o más elementos no transcritos, tales como un origen de la replicación, un promotor y un mejorador adecuados unidos al gen que se debe expresar, otras secuencias no transcritas flanqueadoras 5' o 3', secuencias no traducidas 5' o 3' (tales como sitios de unión a ribosoma necesarios), un sitio de poliadenilación, sitios de "splicing" (corte-eliminación-unión) de donante y aceptante, o secuencias de terminación de la transcripción. También puede incorporarse un origen de la replicación que confiera capacidad para la replicación en un host.

35 [0126] Las secuencias de control transcripcional y traduccional presentes en los vectores de expresión a usar en la transformación de células de vertebrados pueden proporcionarse mediante fuentes víricas. Pueden construirse vectores ejemplares, de la manera descrita en Okayama y Berg (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3:280.

40 [0127] Los marcadores de selección que se pueden usar en el sistema comprenden los conocidos en este campo del conocimiento, tales como marcadores de selección positivos y negativos, como, entre otros posibles, genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, un gen de resistencia a la neomicina, un gen de resistencia a la higromicina, un gen de resistencia a la kanamicina, un gen de resistencia a la tetraciclina, un gen de resistencia a la penicilina), gen HSV-TK (gen de la timidina quinasa del virus *Herpes simplex*), derivados del HSV-TK para la selección del ganciclovir, o gen de la purina nucleósido fosforilasa bacteriana para la selección de la 6-metilpurina (Gadi *et al.* (2000) *Gene Ther.* 7:1738-1743). [0034] Una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación del mismo puede estar presente antes o después de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés o el sitio de clonación del mismo.

50 [0128] Un vector puede comprender uno o más promotores, como, entre otros posibles, un promotor constitutivo, inducible, específico de host, y/o específico de tejido. Por ejemplo, se derivan promotores y mejoradores, usados comúnmente, del citomegalovirus (CMV) humano, del adenovirus 2, del virus simiano 40 (SV40, por sus siglas en inglés), y de los poliomavirus. Se pueden utilizar, para impulsar la expresión, promotores genómicos víricos y secuencias de control y/o de señalización que dependen de células host compatibles. También pueden emplearse promotores derivados de genes de mantenimiento (genes "house-keeping") (por ejemplo, los promotores de la β -globina, de la timidina quinasa, y del EF-1 α [factor de elongación 1-alfa]), en función de la identidad del tipo de célula en la que se va a expresar el vector. Un promotor puede estar presente antes de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más polipéptidos de interés.

60 [0129] Los vectores pueden contener uno o más sitios de entrada internos del ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés). La inclusión de una secuencia con IRES en vectores de fusión puede resultar beneficioso para aumentar la expresión de algunas proteínas.

65 [0130] El sistema vector puede incluir uno o más sitios de poliadenilación (por ejemplo, SV40), que pueden estar presentes antes o después de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos mencionadas.

- 5 [0131] Los componentes del vector pueden unirse de manera contigua entre sí, o disponerse de una manera que proporcione un espaciado óptimo para la expresión de los productos génicos (es decir, mediante la introducción de nucleótidos "espaciadores" entre los marcos abiertos de lectura [ORFs, por sus siglas en inglés]), o situarse de otra manera. Los elementos reguladores, tales como el motivo IRES, también pueden disponerse de manera que proporcione un espaciado óptimo para la expresión.
- 10 [0132] Las células transfectadas con vectores de expresión pueden seleccionarse en condiciones de selección de células positivas y/o seleccionarse con arreglo a la expresión de proteínas recombinantes. Se expanden (se cultivan en cultivos) las células recombinantes-positivas y se analizan a fin de seleccionar subclones que exhiban un fenotipo deseado.
- 15 [0133] Con los vectores de expresión pueden transformarse células, incluidas las eucarióticas y procarióticas. Por eso, aquí se describe una célula host transformada con un vector de expresión. Las células host adecuadas son preferiblemente células eucarióticas, más preferiblemente células de origen vegetal, de roedor o humano, como, por ejemplo, entre otras posibles, células NSO, CHO, perC.6, Tk-ts13, BHK, HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, células L, C127, 3T3, HeLa, NS1, células de mieloma Sp2/0, y líneas de células BHK.
- 20 [0134] En general, la transfección se lleva a cabo usando una suspensión de células, o una sola célula, aunque también puede aplicarse otros métodos en la medida en que una fracción suficiente de las células o tejido tratados incorpore el polinucleótido; con ello, resulta posible cultivar y utilizar las células transfectadas. Las técnicas para la transfección son bien conocidas. En este campo del conocimiento se conocen varios protocolos de transformación. Véase, por ejemplo, Kaufman (1988) *Meth. Enzymology* 185:537. Como comprenderán fácilmente los expertos en la materia, el protocolo de transformación adecuado viene determinado por el tipo de célula host y por la naturaleza del gen de interés. Los componentes básicos de todo dicho protocolo incluyen introducir una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés en una célula host adecuada, y después, identificar y aislar las células host que han incorporado el ADN del vector de una manera expresable estable. Son técnicas para la introducción de polinucleótidos, entre otras posibles, las siguientes: electroporación, transducción, fusión celular, uso de cloruro cálcico, y empaquetado del polinucleótido con lípido para fusión con las células de interés. Si la transfección es estable, de manera tal que el gen marcador seleccionable se expresa en una cantidad uniforme durante múltiples generaciones de células, se obtiene una línea celular.
- 25 [0135] Un método usado comúnmente para la transfección en células de mamíferos en particular es la precipitación con fosfato cálcico. Otro método es la fusión, inducida por polietilenglicol (PEG), de protoplastos bacterianos con células de mamíferos. Schaffner *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2163. Otro método es la electroporación, que también puede usarse para introducir ADN directamente en el citoplasma de una célula host, como se describe, por ejemplo, en Potter *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7161.
- 30 [0136] La transfección de ADN puede también llevarse a cabo usando reactivos tipo poliliposomas tales como Lipofectina y Lipofectamina (que comercializa la empresa Gibco BRL [Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos]), que forman complejos lípido-ácido nucleico (o liposomas) que, cuando son aplicados a células cultivadas, facilitan la captación del ácido nucleico hasta el interior de las células.
- 35 [0137] Una vez que se ha identificado una célula que expresa la proteína deseada, dicha célula puede ser expandida y seleccionada. Hay una serie de maneras de seleccionar células transfectadas. Por ejemplo, se pueden seleccionar células que expresen el polipéptido de interés. En los caso en que el vector contiene también un gen de resistencia a antibióticos, pueden seleccionarse las células basándose en las que muestren dicha resistencia a antibióticos, con lo cual, se seleccionan, sin lugar a dudas, células que contienen el vector. Puede dejarse que las células crezcan en condiciones selectivas.
- 40 [0138] Una vez que se ha identificado un clon celular que produce una proteína, puede analizarse aún más esa línea, a fin de identificar subclones que tengan uno o más fenotipos deseados, como, entre otros posibles, células que exhiban expresión de niveles altos, o propiedades de crecimiento mejoradas, y/o capacidad para producir proteínas con las características bioquímicas deseadas (por ejemplo, a raíz de modificación de las proteínas y/o de modificaciones postraduccionales alteradas). Dichos fenotipos pueden deberse a propiedades inherentes a un subclon dado o a mutagénesis. La mutagénesis puede llevarse a cabo mediante sustancias químicas, luz de longitud de onda UV, radiación, virus, mutágenos insercionales, reparación deficiente del ADN o mediante una combinación de estos métodos de mutagénesis.
- 45 [0141] En las aplicaciones profilácticas se administran composiciones farmacéuticas en una cantidad profilácticamente eficaz a un paciente susceptible a una enfermedad o estado patológico, o que de algún otro modo está en riesgo de padecer una enfermedad o estado patológico (por ejemplo, cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria). Son individuos que tienen dicho riesgo, entre otros posibles, los siguientes: individuos con antecedentes familiares de cáncer, enfermedad infecciosa o enfermedad inflamatoria, individuos ya tratados anteriormente contra el cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria, e individuos que presentan cualquier otro indicio clínico que indique que tienen una probabilidad elevada de que aparezca en ellos
- 50
- 55
- 60
- 65

cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria. Descrito de otra manera, un individuo que está en riesgo es cualquier individuo de quien se cree que tiene un riesgo mayor que el de la población general, de que aparezca en él cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria. Cuando aquí se usa el término "cantidad profilácticamente eficaz", se quiere dar a entender que ello se refiere a una cantidad, de una formulación, que produce un efecto observado tal como la prevención de la aparición o de la de un cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria. En general, las cantidades profilácticamente eficaces de una formulación son determinadas por el efecto que ejercen, en comparación con el efecto observado cuando se administra una segunda formulación que carece del principio activo, a un individuo que está en una situación similar.

[0142] En las aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones a un paciente que se sospecha que padece una enfermedad de las mencionadas, o que ya padecía una de tales enfermedades, en una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para curar, o al menos ralentizar o detener parcialmente, los síntomas (bioquímicos y/o histológicos) de dicha enfermedad, incluidas las complicaciones y los fenotipos patológicos que aparecen durante el desarrollo de la misma.

[0143] Tanto en las pautas profilácticas como en las terapéuticas, las sustancias se suelen administrar en varias dosis, hasta lograrse una respuesta suficiente. Normalmente, se monitoriza la respuesta y se administran dosis repetidas si la respuesta empieza a decaer.

[0144] Las dosis eficaces de un anticuerpo monoclonal para el tratamiento de una enfermedad, como, por ejemplo, cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria, tal y como aquí se describe, varían en función de muchos factores diferentes; entre otros, en función de los siguientes: modo de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, condición del paciente en cuanto a si es humano o animal, otras medicaciones administradas y tipo de tratamiento en cuanto a si es profiláctico o terapéutico. Habitualmente el paciente es un ser humano, pero también se puede tratar a mamíferos no humanos.

[0145] La posología depende de la severidad del estado patológico a tratar y de la capacidad de respuesta a dicho estado patológico a tratar; el período de tratamiento puede ser de un día o dos, varios días, varios meses, o hasta que se logre la cura o una reducción del estado patológico. Se pueden calcular calendarios posológicos óptimos a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el organismo de un paciente o sujeto. Los expertos en la materia pueden determinar con facilidad las posologías óptimas, las metodologías posológicas y los porcentajes de repetición. Las posologías óptimas pueden variar en función de la potencia relativa de cada anticuerpo y, en caso de administración concomitante, de la potencia relativa de los fármacos conocidos que se empleen para el tratamiento de la enfermedad. Por lo general las posologías óptimas pueden calcularse basándose en las CE50s que se determinen como eficaces en modelos animales *in vivo* e *in vitro*.

[0146] En general, la dosis está comprendida en un intervalo de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal y puede administrarse una o más veces al día, a la semana, al mes o al año o, incluso, desde una vez cada 2 años hasta una vez cada 20 años. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar, además, en función de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja, a intervalos relativamente infrecuentes, a lo largo de un período prolongado de tiempo. Algunos pacientes siguen recibiendo tratamiento durante el resto de su vida. En las aplicaciones terapéuticas, a veces resulta necesario administrar dosis relativamente altas, a intervalos relativamente cortos, hasta que se ha reducido o detenido la progresión de la enfermedad y, preferiblemente, hasta que el paciente muestra un alivio parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, al paciente se le puede administrar una pauta posológica profiláctica.

[0147] Aunque las necesidades individuales pueden variar, resulta posible, conforme a lo conocido en este campo de la técnica, determinar los intervalos óptimos de las cantidades eficaces de las formulaciones. Las dosis en humanos pueden extrapolarse a partir de estudios en animales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20TH ED., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, Estados Unidos, 2000). Generalmente la dosis requerida para proporcionar una cantidad eficaz de una formulación, que puede ser ajustada por cualquier entendido en la materia, variará en función de la edad, de la salud, del estado físico, del peso, del tipo de enfermedad o trastorno del receptor, de si la enfermedad o trastorno está en estado avanzado o no, de la frecuencia de tratamiento, de la naturaleza de los tratamientos concurrentes (si los hay), de la naturaleza del efecto o efectos deseados, y del alcance de dicho efecto o efectos.

[0148] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse de manera que incluyan un transportador farmacéuticamente aceptable. Son transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados los siguientes: agua, PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina (por ejemplo, solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, carbohidratos (tales como lactosa, amilosa o almidón), ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidina. Tales preparaciones pueden esterilizarse y, si se desea, pueden mezclarse con sustancias auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, humectantes, emulgentes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, y colorantes. Los transportadores farmacéuticos adecuados para uso en la presente invención son conocidos en este campo del conocimiento (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20TH ED., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, Estados Unidos, 2000).

[0149] Las formulaciones farmacéuticas, que pueden presentarse en forma de dosis unitaria para mayor facilidad/comodidad de uso, pueden prepararse conforme a técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas comprenden el paso de la puesta en asociación de los ingredientes activos con el transportador o transportadores farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación, de manera uniforme e íntima, los ingredientes activos con transportadores líquidos o con transportadores sólidos divididos finamente, o con ambos tipos de transportadores. Las formulaciones pueden presentarse en contenedores de dosis unitaria o de varias dosis, como, por ejemplo, ampollas y viales cerrados, y se pueden almacenar en estado congelado o liofilizado, de manera que únicamente haya que añadir transportador líquido estéril justo antes de usar la formulación.

[0150] Por lo general, las composiciones farmacéuticas se formulan en estado estéril, esencialmente isotónicas, y cumpliendo plenamente con todas las normativas de la *U.S. Food and Drug Administration* (Organismo para el Control de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) en materia de buenas prácticas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés).

[0151] En el estado de la técnica existen directrices adicionales en lo referente a la formulación, a las dosis y a las pautas de administración (Berkow *et al.*, 1997, *THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION*, Home, ed., Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, Nueva Jersey, Estados Unidos; Goodman *et al.*, 1996, *GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS*, 9th ed. McGraw-Hill Health Professions Division, Nueva York; Ebadi, 1998, *CRC DESK REFERENCE OF CLINICAL PHARMACOLOGY*, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Katzung, 2001, *BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY*, 8th ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Division, Nueva York; Speight *et al.*, 1997, *AVERV'S DRUG TREATMENT; A GUIDE TO THE PROPERTIES, CHOICE, THERAPEUTIC USE AND ECONOMIC VALUE OF DRUGS IN DISEASE MANAGEMENT*, 4th ed. Adis International, Auckland/Philadelphia, Pensilvania, Estados Unidos).

[0152] Cuando se usan como tratamiento farmacéutico, las composiciones de la presente invención pueden administrarse como tratamiento único o coadministrarse con otros compuestos u otras composiciones que se usan en el tratamiento de una enfermedad, como por ejemplo cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria. Son ejemplos de tales compuestos, que en el contexto de la presente invención se denominan "compuestos suplementarios" o "composiciones suplementarias", los siguientes (entre otros posibles): antibióticos, anticitoquinas, fármacos antiasmáticos, antifosfolipasas (por ejemplo, inhibidores de las fosfolipasas), vasodilatadores (por ejemplo, adenosina, agonistas beta-adrenérgicos o antagonistas beta-adrenérgicos, bloqueantes β -adrenérgicos, bloqueantes α -adrenérgicos, diuréticos, vasodilatadores de la musculatura lisa, nitratos, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina), biomoléculas, citostáticos, y quimioterápicos. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender, por ejemplo, uno o más compuestos suplementarios. En algunas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con el compuesto suplementario.

[0153] En esta invención se describen también kits para, por ejemplo, el tratamiento del cáncer, de una enfermedad infecciosa o de una enfermedad inflamatoria.

[0154] Los kits comprenden un anticuerpo de la invención o una composición del anticuerpo o anticuerpos de la invención, así como instrucciones para usar el kit en un método de tratamiento del cáncer, de una enfermedad infecciosa o de una enfermedad inflamatoria en un paciente, o para usar el kit en un método de inhibición de la actividad biológica del antígeno diana (por ejemplo, el GM-CSF). El kit puede comprender al menos un compuesto suplementario. El kit puede comprender instrucciones y/o medios para la administración del anticuerpo o composición de anticuerpos mediante, por ejemplo, inyección.

[0155] Los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar antígeno en una muestra biológica tal como, entre otras posibles, suero sanguíneo. Puede emplearse cualquier método conocido en este campo del conocimiento, como, entre otros posibles, citometría de flujo. Por ejemplo, una muestra biológica puede incubarse con anticuerpo de la invención, y después, procederse a lavado e incubación con un anticuerpo secundario marcado. Por ejemplo, el anticuerpo secundario puede tener como diana la cadena ligera y conjugarse con FITC o con ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés), con la finalidad de detección.

[0156] La actividad neutralizadora del antígeno de los anticuerpos de la invención puede someterse a prueba en un ensayo de neutralización del antígeno mediante cualquiera de los métodos conocidos en este campo del conocimiento. Por ejemplo, la actividad neutralizadora de los anticuerpos puede evaluarse usando líneas celulares dependientes de antígeno. Son ejemplos de líneas celulares dependientes de GM-CSF, entre otras, las líneas celulares TF-1 y AML-193.

[0157] En un primer ensayo de neutralización del antígeno, células dependientes de antígeno se suspenden en medio de ensayo, o medio de ensayo, antígeno o antígeno incubado previamente durante una hora con anticuerpos de ensayo o anticuerpos isotipo de control. Tras el período de incubación, se evalúa la inhibición del crecimiento mediante cualquier método conocido en este campo del conocimiento. Por ejemplo, se puede añadir reactivo Cell Titer (Promega, Wisconsin, Estados Unidos), y después, procederse a incubación adicional, a medición de la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en un espectrofotómetro y a resta, de las

muestras, del "ruido de fondo" ("fondo") del medio. El porcentaje de neutralización del antígeno se calcula de la siguiente manera: $100 - [(D.O. \text{ con Ig} / D.O. \text{ sin Ig}) \times 100]$.

[0158] En otro ensayo de neutralización, se mezcla el antígeno con los anticuerpos anti-antígeno de la invención. Se añaden a la mezcla células dependientes de antígeno, y después, se procede a incubación. Tras el período de incubación, se mide la inhibición del crecimiento. Por ejemplo, puede añadirse el marcador MTS (que es un marcador de la proliferación del ADN), y después, medirse la incorporación de tinte. Una disminución de la incorporación de tinte en presencia del anticuerpo, en comparación con el nivel de incorporación de tinte en ausencia del anticuerpo anti-antígeno, indica que hay neutralización del antígeno.

[0159] En otra opción, se hacen crecer células dependientes de antígeno en presencia del antígeno, y después, se añaden cantidades crecientes de anticuerpo al medio de cultivo y se efectúa la evaluación de la actividad neutralizadora como se acaba de describir.

[0160] Los anticuerpos de la invención y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden usarse en métodos para la inhibición de la actividad biológica de un antígeno diana, como, por ejemplo, el GM-CSF, así como usarse en métodos de tratamiento de una enfermedad tal como, entre otras posibles, cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria, mediante la administración de las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la invención a un paciente o sujeto que las necesite. La actividad biológica del GM-CSF comprende su unión al receptor del GM-CSF. Los anticuerpos de la invención y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden usarse en métodos empleados para, por ejemplo, efectuar el tratamiento profiláctico o tratamiento terapéutico de una enfermedad tal como, entre otras posibles, cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad inflamatoria.

[0161] Los anticuerpos de la invención y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden usarse en métodos terapéuticos adecuados para uso en seres humanos y en animales no humanos. Son animales no humanos que se benefician de la invención, entre otros, los animales de compañía, los animales exóticos (por ejemplo, los animales de zoológico) y el ganado doméstico. Preferiblemente, los animales no humanos son mamíferos.

[0162] Los anticuerpos de la invención pueden administrarse por vía oral, en cualquier forma de dosificación aceptable, tal como cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas, soluciones o similares. Los anticuerpos pueden administrarse también por vía parenteral; es decir, mediante cualquiera de las siguientes técnicas de inyección o infusión: subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinovial, intraesternal, intranasal, tópica, intratecal, intrahepática, intralesional, e intracraneal. En general, los anticuerpos se proporcionarán en forma de inyección intramuscular o intravenosa.

[0163] Los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o con un transportador farmacéuticamente aceptable, incluidos adyuvantes, vehículos y excipientes aceptables.

[0164] Los anticuerpos de la invención pueden administrarse antes de, después de, o en simultaneidad con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden administrarse como tratamiento único o coadministrarse con un compuesto suplementario.

[0165] Los anticuerpos de la invención pueden administrarse en forma de mezcla homogénea de anticuerpo conjugado o sin conjugar, o en forma de mezcla heterogénea de anticuerpo conjugado y sin conjugar.

[0166] Puede evaluarse, de diversas maneras, si el tratamiento es eficaz. En una realización, el tratamiento eficaz del cáncer, de una enfermedad infecciosa o de una enfermedad inflamatoria viene determinado por una ralentización de la progresión de la enfermedad. En otras realizaciones, el tratamiento se considera eficaz cuando produce un bienestar creciente del paciente, hecho que se puede medir con arreglo a signos tales como ganancia de peso, fuerzas recuperadas, menor dolor, crecimiento vigoroso, así como con arreglo a las indicaciones subjetivas que el paciente notifique, en cuanto a que se siente mejor.

Para que esta invención puede ser entendida y puesta en práctica con mayor facilidad, a continuación se hará referencia a uno o más ejemplos; en dichos ejemplos, se describe al menos parte de la presente invención a partir del trabajo experimental llevado a cabo durante el desarrollo de la misma. Cualesquiera ejemplos que no recaigan dentro del ámbito de las reivindicaciones se proporcionan únicamente como información complementaria.

Ejemplo 1

Generación de MAbs humanos específicos de antígeno contra el GM-CSF

Materiales y métodos

[0168] **Células B humanas, inmunización *ex-vivo* y cultivos celulares.** En todos los procedimientos seguidos,

las células se cultivaron en CO₂ al 5%, a 37 °C. Se obtuvieron conjuntos de células (“leukopacks”) de individuos sanos vacunados contra el toxoide tetánico (TT). Se purificaron PBMCs mediante Ficoll-Plaque (Amersham BioSciences) y se aislaron células B positivas a CD19, así como células T positivas a CD4, a partir de PBMCs, mediante el kit EasySep® (StemCell Technologies) de selección de CD4 y CD19 humanas, respectivamente; se mezclaron dichas células a fin de obtener un grupo de células B/células T (“células BT4”). Las células BT4 se cultivaron en RPMI1640 completo (Invitrogen, California, Estados Unidos) que contenía AB (anticuerpo) de suero humano inactivado por el calor (Nabi, Florida, Estados Unidos), al 10%, así como L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, y 2-mercaptoetanol 55 µM (Invitrogen, California, Estados Unidos).

[0169] Para las inmunizaciones *ex-vivo*, se co-cultivaron las células BT4 en presencia de epítomos de células T y células B. Descrito brevemente, se sembraron células BT4 a una densidad de 10⁶/ml en RPMI completo que contenía 1 U/ml de toxoide tetánico (TT) (Cylex, Maryland, Estados Unidos), en presencia de PBMCs autólogas irradiadas a una proporción 1:1, a fin de producir células T activadas (“grupo T” [grupo de células T]). A fin generar células B activadas contra el antígeno (“grupo B”), se sembraron células BT4 a una densidad de 3 x 10⁶ células/ml, en RPMI completo que contenía AB sérico humano al 10%, medio acondicionado por células T al 5%, 20 U/ml de IL-2, 0,5 ng/ml de IL-6, 100 U/ml de IL-10 (PreproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos), y 250 ng/ml de un cóctel de péptidos (bio-World, Ohio, Estados Unidos) que representaban diversas regiones del antígeno diana, sintetizados de manera que contuviesen epítomos tanto de células T como de células B, tal y como se había descrito previamente (Zafiroopoulos *et al.* (1997) *J. Immunol. Methods* 200:181-90).

[0170] Los epítomos de células B seleccionados para el GM-CSF fueron: EHVNAIQEARRLLNL (SEC N.º ID: 3), STQPWEHVNAIQEAR (SEC N.º ID: 4), MASHYKQHCPTPET (SEC N.º ID: 5).

[0171] Se cultivaron grupos T y grupos B por separado, durante 7 días, y luego se co-cultivaron (10⁶ células/ml) a una proporción 1:10, respectivamente, sobre una monocapa de células alimentadoras de CHO irradiadas, en RPMI completo que contenía suero con AB humano inactivado por el calor, al 10%, así como 400 U/ml de IL-4 (PepruTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). Transcurridos cinco días, se fusionaron los grupos T y B co-cultivados, a fin de generar hibridomas, de la manera ya descrita.

[0172] Para la inmortalización de las células B de pacientes aquejados de proteinosis alveolar pulmonar (PAP), se procesaron 100 ml de sangre entera, a fin de purificar las PBMCs. Se cultivaron los linfocitos durante 7-10 días en RPMI completo que contenía suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 10%, inactivado por el calor (producido por JRH Biosciences, Kansas, Estados Unidos), 2 ng/ml de IL-4 (PepruTech, Nueva Jersey, Estados Unidos), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 55 µM (Invitrogen, California, Estados Unidos), 50 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de forbol-miristato-acetato (PMA, por sus siglas en inglés) y 0,5 µg/ml de ciclosporina A (Sigma, Misuri, Estados Unidos), en presencia de células alimentadoras de CHO irradiadas. Después, se electrofusionaron dichos linfocitos, como se describe a continuación.

[0173] **Fusión celular y selección, mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), de los hibridomas reactivos frente al antígeno.** Las células B humanas empleadas para la generación de los MAbs concebidos para su administración a seres humanos podrían constituir un posible vehículo de transmisión de virus. Se analizaron y seleccionaron previamente, mediante PCR, células socias de fusión y PBMCs de donantes sanos, a fin de confirmar la ausencia de ADN vírico, tal como, por ejemplo, ADN de virus de la inmunodeficiencia 1 y 2, de virus de la hepatitis B y C, de citomegalovirus, de herpesvirus 6 y de virus de Epstein-Barr. Después, se fusionaron los linfocitos con células K6H6/B5 (ATCC, Virginia, Estados Unidos) usando el aparato CYTOPULSE CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences, Inc., Maryland, Estados Unidos), a una proporción 1:1 entre linfocitos y células K6H6/B5.

[0174] Tras la fusión, se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos de fondo plano, a razón de unas ~5000 células/pocillo, en RPMI completo que contenía FBS (inactivado por el calor) al 10%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 55 µM (Invitrogen, California, Estados Unidos), hipoxantina 100 µM, aminopterina 0,4 µM, y timidina 16 µM (HAT, Sigma, Misuri, Estados Unidos). Se recambió el medio semanalmente y se mantuvo la selección mediante HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) hasta la conclusión del análisis de la reactividad frente al antígeno (3-5 semanas).

[0175] Para la identificación de los MAbs reactivos frente al antígeno, se llevaron a cabo análisis basados en ELISA, usando un sistema BIOMEK FX de manipulación de líquidos integrado con una lavadora de placas y un espectrofotómetro (un sistema robótico). Descrito brevemente, se recubrieron placas de microtítulos, a temperatura ambiente, durante 6 horas, con 50 µl/pocillo de antígeno recombinante (1 µg/ml de GM-CSF) producido en el laboratorio, diluidos en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,4). Después, las placas se bloquearon con tampón de unión (PBS que contenía BSA al 1% [Sigma, Misuri, Estados Unidos] y Tween 20 al 0,05% [BioRad, California, Estados Unidos]), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,05%), y se transfirieron a las placas de ELISA 50 µl/pocillo de sobrenadante de hibridoma. La reacción de unión se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, las placas se lavaron 4 veces y se añadieron 100 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG+M humanas conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pensilvania, Estados Unidos), diluidos al 1:10000 en tampón de unión, tras lo que se llevaron a cabo las reacciones

a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Por último, las placas se lavaron 4 veces y se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato SureBlue (KPL, Maryland, Estados Unidos), durante 10 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 N, y se determinó la absorbancia a 450 nm.

5 [0176] **Análisis para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).** Los pasos de unión a Ig y de lavado de las células se llevaron a cabo usando tampón de unión (DPBS [tampón salino fosfatado de Dulbecco] helado, sin calcio ni magnesio, BSA al 0,5%); las reacciones se prepararon en microplacas con fondo en forma de V; y las muestras se analizaron usando un aparato FACSAria (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos). Para el experimento de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) que se ilustra en la Figura 3A, se cargaron 10^6 de células de hibridoma murino anti-GM-CSF (células Mull9/2) con 100 ng/reacción de GM-CSF, y luego se incubaron dichas células con el MAb humano E5 (anti-GM-CSF). La unión de los MAbs específicos de GM-CSF se detectó con 10 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-Ig humana, marcado con FITC (SouthernBiotech, Alabama, Estados Unidos). Para el experimento FACS que se ilustra en la Figura 3B, se lavaron las células de hibridoma E10 y luego se sembraron dichas células, a razón de 50000 células/pocillo, en un volumen de 90 µl. Después, se añadieron diez µl de GM-CSF marcado con ficoeritrina (PE, por sus siglas en inglés) (R&D Systems, Minesota, Estados Unidos) a cada pocillo, y se incubaron las células durante una hora, sobre hielo. Para la competición por el GM-CSF sin marcar, se preincubaron las células de hibridoma con 5 µg/ml de GM-CSF humano recombinante (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos), a temperatura ambiente durante una hora, se lavaron tres veces dichas células, y luego se incubaron con PE-GM-CSF, de la forma anteriormente descrita, antes del análisis. Para el experimento FACS que se ilustra en la Figura 4, se tiñeron células A431 y A431-K5 (cortesía del Dr. Ira Pastan, National Cancer Institute [Instituto Estadounidense del Cáncer]) con 10 µg/ml de MAb C12 o de IgM humana normal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pensilvania, Estados Unidos) diluidos en tampón de unión, y se llevaron a cabo las reacciones de la forma anteriormente descrita.

25 [0177] **Bioensayo de neutralización del GM-CSF.** Se cultivó la línea celular TF-1 de eritroleucemia humana, dependiente de GM-CSF (ATCC, Virginia, Estados Unidos), en RPMI 1640 completo (véase anteriormente) que contenía 10 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). El día anterior al experimento, se cultivaron células TF-1 en FBS al 0,1% en ausencia de GM-CSF. Las células privadas se lavaron dos veces, se resuspendieron en medio de ensayo y se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una concentración de 10000 células/pocillo. Los pocillos contenían medio de ensayo, 100 pg/ml de GM-CSF, o GM-CSF incubado previamente durante una hora con Ig de prueba o isotipo de control, a las concentraciones indicadas en las leyendas de la figura. Transcurridos 3 días, se añadieron 40 µl de reactivo Cell Titer (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) a cada pocillo, y se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en espectrofotómetro, y se restó de las muestras el "ruido de fondo" ("fondo") del medio. Se calculó el porcentaje de neutralización del GM-CSF, de la siguiente manera: $100 - [(D.O. \text{ con Ig} / D.O. \text{ sin Ig}) \times 100]$.

40 [0178] **Cambio de clase (cambio isotípico) de los anticuerpos.** Las células de hibridoma se lavaron una vez con 10 ml de PBS, se resuspendieron en RPMI completo, se sembraron en microplacas de 96 pocillos de fondo plano, y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5%. Transcurridos cuatro días, las células se resuspendieron mediante pipeteo y se transfirieron 100 µl de ellas a 20 placas ELISPOT (Millipore, Massachusetts, Estados Unidos) recubiertas con 2,3 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana (Jackson Immunoresearch, Pensilvania, Estados Unidos). A las células restantes en las placas de tejido se les alimentó con 100 µl adicionales de RPMI completo. Tras incubación durante toda la noche, se lavaron las placas ELISPOT tres veces con PBS que contenía Tween (PBST) al 0,05%; después, se añadieron 100 µl de 2 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana, conjugado con HRP, y se incubaron las placas durante una hora a temperatura ambiente, con agitación. Se lavaron las placas tres veces con PBST; después, se añadieron 100 µl de solución sustrato con AEC (3-aminoetil-carbazol) (Sigma, St. Louis, Misuri, Estados Unidos) a los pocillos, y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente, con agitación. Se aspiró el sustrato, se lavaron con dH₂O las placas, y se dejó que se secasen al aire. Se expandieron los clones de los pocillos que mostraban puntos (manchas) positivos (que indicaban producción de IgG). El paso que se acaba de describir se repitió secuencialmente mediante resembrado de los clones positivos, a concentraciones de 1000, 100, 10 y 0,25 células/pocillo, y se llevó un seguimiento de los pocillos positivos hasta identificar una colonia de una única célula que secretaba IgG.

55 [0179] **Fermentación, usando fibras huecas y un biorreactor agitado.** Se sembraron las células a razón de $2,5 \times 10^5$ /ml en un biorreactor de 2 litros (B Braun Stat B-DU) que contenía 1 litro de medio HyQCDM4NS0 sin suero (HyClone, Utah, Estados Unidos), manteniendo los niveles de glucosa y de glutamina a concentraciones de 6 g/l y 4 mM, respectivamente. Los puntos de referencia controlados fueron: pH 7,1, saturación de un 40% de dO₂ con aire, temperatura de 37 °C, y velocidades de agitación de 80 rpm. Se cosecharon dos ml de muestra al día: 1 ml para recuento celular usando un aparato Cedex, y 1 ml para medir las concentraciones de Ig mediante ELISA. Para el procesado con las fibras huecas, se sembraron 10^8 células viables en un sistema FiberCell (Bellco, Nueva Jersey, Estados Unidos) que contenía 15 ml de RPMI completo y, cuando se hubo consumido el 50% de la glucosa, se volvieron a alimentar usando un depósito integrado que contenía un litro de medio recién preparado.

[0180] **Inhibición de la reparación de discordancias a fin de incrementar la diversidad genética de las líneas de hibridoma.** Se cultivaron células de hibridoma en RPMI completo (control negativo) o en RPMI completo que contenía una concentración 250 μM o 500 μM de compuesto antraceno inhibidor de la MMR (reparación de discordancias). Si hicieron pasar las células, a una dilución 1:5 cada tres o cuatro días, por medio recién preparado, con o sin morfoceno; transcurridas tres semanas, las células se cosecharon y se resuspendieron a razón de 2×10^6 células/ml en tampón para FACS (PBS con BSA al 1%). Se tiñeron las células con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de cabra anti-Ig humana conjugado con FITC (Jackson Immunoresearch), durante 30 minutos, sobre hielo. Dichas células se lavaron con 10 ml de tampón para FACS helado y se resuspendieron en 3 ml de tampón para FACS. Se añadieron 10 μl de Viaprobe (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos), durante 5 minutos, sobre hielo, y se clasificaron las células viables en función de una alta tinción de superficie con Ig, en un clasificador de células FACSAria (Becton Dickinson). La condición (la "puerta lógica") se definió de manera que se seleccionasen las células que representaban el 5% de la subpoblación con la mayor tinción de superficie con Ig. Para la selección de clones con concentraciones mayores, las células clasificadas mediante FACS se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en forma de U, y se incubaron durante una semana a 37 °C en CO_2 al 5%. Se cosecharon cincuenta μl de sobrenadantes de los pocillos y se analizó su producción de IgM mediante ELISA, usando placas recubiertas de anticuerpo de cabra anti-IgM+G humanas. Como control interno, se sembraron 3 pocillos de cada placa de ELISA con 50 μl de 10 ng/ml de IgM humana (Jackson Immunoresearch). Los valores de D.O. obtenidos a 450 nm se normalizaron a los valores medios de los pocillos de control internos. Los pocillos que mostraban señales de IgM intensas se expandieron para análisis adicional. Para el análisis de la inestabilidad de microsátelites (MSI, por sus siglas en inglés), se extrajo ADN de células parentales o tratadas con morfoceno, usando el kit DNeasy Tissue (Qiagen). El marcador de repeticiones poliA en BAT (7) se amplificó usando los cebadores BAT-26-F (5'-tcaccatccattgcacagtt-3') (SEC N.º ID: 20) y BAT-26-R (5'-ctgcgagaaggctaccacc-3') (SEC N.º ID: 21), marcados fluorescentemente con D4, y la polimerasa de alta fidelidad pfuUltra™ (Stratagene, California, Estados Unidos); las reacciones se incubaron de la siguiente manera: 5 minutos a 95 °C; 9 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 2 minutos a 72 °C, con la temperatura de anillado disminuyendo 1 °C cada ciclo; 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 52 °C, y 2 minutos a 72 °C; extensión final de 10 minutos a 72 °C. Se obtuvieron copias únicas del alelo del marcador mediante el uso de una dilución de ADN que proporcionó un amplicón en sólo el 50% de las reacciones PCR. Los productos de la PCR se diluyeron 1:10 con una solución para carga de muestras CEQ, y luego se cargaron en el sistema de análisis genético Beckman CEQ 8000, para el análisis de los fragmentos.

[0181] **Generación de MAbs humanos específicos de antígeno.** Se llevaron a cabo inmunizaciones *ex vivo* usando células B crio-conservadas, obtenidas de sujetos voluntarios (donantes sanos), como se ha descrito anteriormente. En otra opción, se obtuvieron células B de sujetos humanos cuyos sueros contenían niveles altos de MAbs específicos de un antígeno de interés. La metodología de este último enfoque dimana de la posibilidad de que algunos MAbs específicos de antígeno podrían derivarse de una respuesta inmune anómala (como en el caso de los pacientes con trastornos autoinmunes), o derivarse de una respuesta inmune *in vivo* frente a antígenos tumorales, microbianos, o de vacunas.

[0182] Tras la fusión de células inmunizadas *ex vivo*, se identificaron varios MAbs humanos reactivos frente a antígenos; también se identificaron de bibliotecas de hibridoma generadas a partir de células B de pacientes con PAP. Se seleccionaron, para realizar estudios adicionales, cuatro líneas de hibridoma: E5 (IgM), G7 (IgM), E10 (IgG), y G9 (IgG); además, se analizaron mediante ELISA los MAbs humanos que producen, para determinar su especificidad. La Figura 1 muestra que los MAbs humanos E5, G7, y E10 sólo reaccionaron con el GM-CSF humano, y con ninguno de los otros diez antígenos, no relacionados, probados, incluido el GM-CSF murino, que comparte una "identidad" del 53% con su homólogo humano. Se obtuvieron resultados similares con el hibridoma G9. Se llevaron a cabo análisis FACS, a fin de confirmar la especificidad de estos MAbs humanos. Se dejó que el GM-CSF humano se uniese a la superficie de células de hibridoma murinas, que expresan MAbs unidos a membrana, específicos del GM-CSF humano (de un epítipo distinto del mismo). El MAb E5 se unió a la superficie de estas células en estas condiciones, con arreglo a lo indicado por el cambio en la intensidad de la fluorescencia (Figura 2A, panel inferior). Este resultado demuestra la capacidad del MAb E5 para unirse al GM-CSF humano nativo. En ausencia del GM-CSF unido a células, el MAb E5 no estableció reacciones cruzadas con ninguna de las proteínas unidas a membrana expresadas por dichas células de hibridoma (Figura 2A, panel del medio). De manera similar, el MAb E10 mostró, con arreglo al análisis FACS, una especificidad alta. Además, se halló MAb E10 asociado a la membrana de las células de hibridoma; el análisis FACS demostró su capacidad para unirse a GM-CSF soluble, marcado con ficoeritrina (PE) (Figura 2B, panel del medio). La especificidad de unión se demostró mediante preincubación de las células de hibridoma E10 con un exceso de GM-CSF sin marcar (Figura 2B, panel inferior).

[0183] **Cambio de clase (cambio isotípico), de novo, de MAbs humanos.** Usando las dos estrategias descritas, se han generado MAbs humanos (IgG e IgM) frente a una diversidad de antígenos humanos y no humanos. Aunque la mayoría de los anticuerpos terapéuticos que se comercializan son del isotipo IgG, en estudios sobre cáncer en los que se han analizado MAbs IgM potencialmente terapéuticos, se ha observado una regresión de los tumores *in vivo* (16, 17). Estas respuestas clínicas pueden ser atribuibles a la capacidad de la IgM de fijar intensamente y activar la ruta del complemento y de destruir eficazmente las células tumorales. La IgG se une a los receptores de Fc presentes en los macrófagos y en las células NK y, por lo tanto, puede mediar la actividad ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) contra las células tumorales. Se pueden someter a prueba tanto la

IgG como la IgM que tienen una especificidad idéntica (mismos antígeno y epítipo), para determinar cuál es su mejor actividad farmacológica *in vivo*. En el caso en el que resulta preferible el isotipo IgG, se ha seguido un procedimiento rápido y robusto (véase Materiales y métodos) para cambio de clase (cambio isotípico) *de novo* de la IgM. Usando como ejemplo la línea E5, se identificó un subconjunto de células que habían cambiado de isotipo (clase), adoptando un isotipo IgG, en las condiciones de cultivo empleadas. La IgG E5 mostró una secuencia nucleotídica idéntica en su región variable, y una reactividad similar frente al GM-CSF (Figura 3), respecto de la secuencia y reactividad de la IgM E5 parental.

[0184] **Actividades biológicas de los MABs humanos.** Las propiedades farmacológicas que se desea que tengan los MABs terapéuticos que tengan como diana mediadores solubles de la enfermedad comprenden la capacidad de neutralizar factores de crecimiento. Como se ha mencionado, un ejemplo tal es el GM-CSF, en su calidad de mediador de la AR (9-11). Se evaluó la capacidad de los MABs humanos para bloquear la funcionalidad del GM-CSF, mediante un ensayo basado en células, en el que el crecimiento de las células eritroblastoides (TF1) humanas depende de la presencia de dicha citoquina en el medio de cultivo de dichas células. Como se ilustra en la Figura 4, tanto E10 como G9 inhibieron notablemente el crecimiento celular dependiente de GM-CSF, mientras que la IgG isotipo de control humana no mostró efecto alguno. La diferencia entre la potencia observada en E10 y la potencia observada en G9 está bien correlacionada con sus afinidades aparentes, 870 y 14 picomolar, respectivamente. El MAB E5 mostró una actividad neutralizadora mínima, acorde a su menor afinidad (5 nM).

[0185] **Determinación de las concentraciones y de la estabilidad de hibridomas secretores de MABs humanos.** Una propiedad importante de una línea de producción de MABs es la estabilidad de la secreción de Ig durante todo el ciclo de fabricación por lotes. En un escenario en el que la duración del ciclo es de unos dos meses, una línea que se duplique cada 24 horas comprendería unas 60 generaciones desde su descongelación hasta su cosecha. Como modelo para evaluar las concentraciones de MABs y la estabilidad de la producción del hibridoma generado usando nuestro método, se usó una línea E5. Un clon derivado de dicha línea, 3D2, mostró un tiempo de duplicación de 24 horas, y se reclonó mediante limitación de las diluciones tras más de dos meses de cultivo continuo. La frecuencia de los clones productores se determinó mediante ELISA, midiendo las concentraciones de Ig en sus medios acondicionados, normalizadas por densidades celulares. La Figura 5A muestra que todos los subclones E5-3D2 analizados secretan niveles altos de Ig, lo que demuestra que, tras 60 generaciones, esta población de células mantiene homogéneamente la producción de Ig. Después, la producción de Ig se evaluó mediante un sistema de fibra hueca a pequeña escala (15 ml). Las células se inocularon en un cartucho de fibra hueca y se alimentaron continuamente usando un depósito integrado que contenía un litro de medio recién preparado. Empezando por el día 5, todo el medio acondicionado del cartucho (15 ml) se cosechó diariamente y se reemplazó, diariamente, con medio recién preparado. Se llevó a cabo fermentación durante 4 días adicionales, y las concentraciones diarias de Ig se determinaron mediante ELISA, usando un estándar de Ig de concentración conocida. Se registró, durante el proceso de 4 días de duración, una concentración acumulada (total) de 1,2 g/l. Entre el día 8 y el día 9, el consumo de glucosa alcanzó su máximo (2 gramos/litro al día), lo que indicó que las células toleraron bien las densidades celulares extremadamente altas. También se evaluó el rendimiento de la producción, en un proceso con alimentación por lotes, de 1 litro, usando un sistema de biorreactor agitado. Se descongelaron las células de una ampolla congelada; luego se inocularon dichas células en un matraz de agitación, y luego se sembraron en una biorreactor agitado (Bauer) que contenía 1 litro de medio sin suero. Se llevó a cabo fermentación hasta que la viabilidad celular cayó por debajo de un 60% (día 6). La producción de Ig y las densidades celulares que se registraron entre el día 1 y el día 5 se muestran en la Figura 5B. Durante la fase logarítmica (días 1-4), se midió una productividad específica de 24 pg/célula/día, así como un tiempo de duplicación promedio de 23,4 horas, de lo que se desprende que la escalabilidad (capacidad de ampliación) del cultivo estas células, del matraz al biorreactor, es buena, y que se mantienen las concentraciones más altas.

[0186] **Optimización genética de un hibridoma secretor de MABs humanos, mediante regulación de la reparación de discordancias.** Ya se había demostrado anteriormente (Nicolaidis *et al.* (1995) *Genomics* 30:195-206; y Nicolaidis *et al.* (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18:1635-41) la utilidad de la mejora de la calidad de las líneas celulares productoras de MABs, usando un proceso denominado morfogenia, que conlleva la regulación transitoria de la MMR. Tras incrementar la diversidad genética del grupo de células usando este método, se llevaron a cabo análisis de alto rendimiento, a fin de identificar los subclones que mostraban (producían) niveles y afinidad más altos (Grasso *et al.* (2004) *Bioprocess Int.* 2:58-64; y Nicolaidis *et al.* (2005) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1059:1-11), o mayores velocidades de crecimiento (Grasso, L. observación personal). Se sometieron células E5 a morfogenia, a fin de demostrar la capacidad para aumentar la diversidad fenotípica de las líneas secretoras de MABs generadas usando nuestra estrategia de hibridomas. Se monitorizó la inhibición de la MMR mediante detección de la inestabilidad de microsatélites (MSI) en el marcador de repeticiones poliA en BAT. De los 24 alelos de BAT analizados en las células expuestas al proceso de morfogenia, 3 alelos mostraron alteraciones; entre ellas, deleciones de nucleótidos únicos, que se ilustran en la Figura 6A e inserciones. No se detectó MSI en ninguno de los 24 alelos de BAT de las células parentales. Después se sembraron, limitando las diluciones en las microplacas, células parentales o células tratadas mediante morfogenia. Se dejó que los clones de células secretasen MABs durante una semana, y se analizó mediante ELISA su medio acondicionado, para determinar las concentraciones de Ig. La frecuencia de los clones con D.O. superior a 1 (alta secreción de Ig) se determinó a partir del número total de clones analizados (3763 en el caso de las células parentales, 2437 en el caso del grupo con morfoceno), y se observó que había aumentado en un 260% ($p = 0,0014$) en la población tratada mediante morfogenia (Figura 6B).

Resumen

[0187] Este estudio representa una estrategia viable para el desarrollo de MAbs humanos para inmunoterapias, usando un proceso optimizado de inmunización *ex-vivo* y de inmortalización de células B humanas, combinado con la inhibición de la reparación de discordancias. Mediante este enfoque se pueden generar MAbs altamente específicos y biológicamente activos, secretados por líneas de hibridoma estables.

[0188] Conforme a los métodos de esta invención, se ha logrado una producción estable de MAbs durante más de 60 duplicaciones y una producción de más de 1 gramo de MAbs por litro durante un proceso de fermentación en fibra hueca de 4 días de duración, de lo que se desprende que las células de hibridoma generadas mediante los presentes métodos son adecuadas para sistemas de perfusión, y potencialmente para la fabricación a gran escala. Además, los hibridomas generados mediante este proceso han tenido un buen comportamiento en procesados en biorreactor alimentados por lotes, lo que sugiere un posible uso, de estas líneas, para aplicaciones comerciales. En resumen, la serie de procesos que conforman la plataforma que aquí se presenta ofrece un enfoque alternativo para un desarrollo rápido y rentable de anticuerpos plenamente humanos, de buena calidad, para uso inmunoterapéutico.

Ejemplo 2**Generación de un anticuerpo plenamente humano anti-GM-CSF: Aislamiento de células de PAP**

[0189] Los pacientes con proteinosis alveolar pulmonar (PAP) del adulto humana acumulan fosfolípidos y proteínas surfactantes en los alvéolos. Se ha formulado la hipótesis de que la PAP se debe a la incapacidad de los macrófagos y células epiteliales de tipo II alveolares para retirar el exceso de surfactante.

Como se ha descrito antes, se ha determinado la función que el GM-CSF desempeña en el control de la homeostasis de surfactante en los pulmones, en el modelo murino, y que, por extensión, es también agente causal de dicha patología (PAP) en humanos. Además, se ha demostrado que los pacientes con PAP tienen anticuerpos neutralizadores circulantes contra el GM-CSF, lo que implica que esta citoquina (el GM-CSF) es causante de dicha enfermedad. No está claro si esta respuesta autoinmune es específica del GM-CSF. No obstante, se ha demostrado que un subconjunto de pacientes con PAP mejoran con el tratamiento a base de GM-CSF, lo que viene a respaldar la hipótesis de que la ausencia de GM-CSF, ya sea por alteración génica o por neutralización (del GM-CSF) mediada por anticuerpos, tiene como consecuencia la aparición y desarrollo de PAP.

[0190] **Aislamiento de anticuerpos específicos de GM-CSF.** Se aislaron, de pacientes con PAP, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés). Descrito brevemente, se obtuvieron, de sangre entera, las células B de un paciente con PAP. Se diluyó la sangre entera con un volumen igual de PBS^{-/-}, y el contenido se mezcló suavemente mediante inversión del contenedor. A 25 ml de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) contenidos en un tubo de 50 ml de capacidad, se les superpusieron 25 ml de sangre diluida. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron PBMCs de la capa de interfaz, usando una pipeta de 10 ml; dichas PBMCs se transfirieron a tubos nuevos de 50 ml, y se lavaron dos veces con PBS^{-/-}. El botón celular (gránulo) de PBMCs se resuspendió en 10 ml de tampón de lisado ACK (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,2), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente a fin de lisar los glóbulos rojos, y se lavó dos veces con PBS^{-/-}.

[0191] **Fusión de células B de PAP con una línea celular de mieloma, a fin de generar un hibridoma.** Se fusionaron células B enriquecidas, obtenidas de pacientes aquejados de PAP, con una variedad de células de mieloma (heterohibridoma humano-murino, ATCC, Virginia, Estados Unidos), células CBF-7 (heterohibridoma humano-murino), células HEK293, y células de mieloma humano, mediante el siguiente método. Las células B y sus células socias de fusión deberían tener una buena viabilidad (≥ 90% viables y en la fase logarítmica). Se contaron ambos tipos de células en su medio original, y se mezclaron en tubos de 15 ml a una proporción 1:1; después, se centrifugaron a 1000 rpm durante 6 minutos a 4 °C. Se lavaron 3 veces usando 10-15 ml de CPFM (medio para fusión con CYTOPULSE, Cyto Pulse Sciences, Maryland, Estados Unidos) frío. El botón celular final se resuspendió en CPFM, 10x10⁶ células/ml. Se efectuó electrofusión usando un aparato CYTOPULSE CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences, Maryland, Estados Unidos). Se optimizaron los parámetros de fusión siguiendo las pautas del fabricante y empíricas, y la eficiencia de fusión media fue de una célula híbrida por cada 5000 células pulsadas. Tras la fusión, se sembraron las células en microplacas de 96 pocillos de fondo plano, a razón de unas ~5000 células/pocillo, en RPMI completo que contenía FBS (inactivado por el calor) al 10%, hipoxantina 100 μM, aminopterina 0,4 μM, y timidina 16 μM (HAT, Sigma, Misuri, Estados Unidos). Se recambió el medio semanalmente, y se mantuvo la selección mediante HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) hasta la conclusión de la selección de la reactividad frente al antígeno.

[0192] **Ensayo de análisis/selección mediante ELISA.** Para la identificación de los MAbs reactivos frente al antígeno, se llevaron a cabo análisis/selecciones basados en ELISA, usando un sistema BIOMEK FX de manipulación de líquidos integrado con una lavadora de placas y un espectrofotómetro (un sistema robótico). Descrito brevemente, se recubrieron placas de microtítulos, a temperatura ambiente, durante 6 horas, con 50 μl/pocillo de antígeno recombinante (1 μg/m de GM-CSF) producido en el laboratorio, diluidos en tampón de

recubrimiento (carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9,4). Después, las placas se bloquearon con tampón de unión (PBS que contenía BSA al 3% [Sigma, Misuri, Estados Unidos] y Tween 20 al 0,05% [BioRad, California, Estados Unidos]), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez con tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,05%) y se transfirieron a las placas de ELISA 50 µl/pocillo de sobrenadante de hibridoma. La reacción de unión se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, las placas se lavaron 4 veces y se añadieron 100 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG+M humanas conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pensilvania, Estados Unidos), diluidos al 1:10000 en tampón de unión, tras lo que se llevaron a cabo las reacciones a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Por último, las placas se lavaron 4 veces y se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato SUREBLUE (KPL, Maryland, Estados Unidos), durante 10 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 N, y se determinó la absorbancia a 450 nm.

[0193] **Análisis y clasificación FACS.** En cada estudio, se llevaron a cabo los pasos de unión a Ig y de lavado de las células usando tampón de unión helado (DPBS sin calcio ni magnesio, BSA al 0,5%). Las PBMCs o células de hibridoma se lavaron y se sembraron a razón de 500000 células/pocillo. Se añadieron anticuerpos anti-CD3, anti-CD19, y anti-CD20 humanas, marcados con FITC y con ficoeritrina (SouthernBiotech, Alabama, Estados Unidos), GM-CSF marcado con ficoeritrina (R&D Systems, Minesota, Estados Unidos) (dilución 10-100), y se incubó durante una hora, sobre hielo. Después, las células se lavaron tres veces con tampón de unión, y se analizaron o clasificaron usando un aparato FACSARIA (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos). En la Figura 9 se muestran los resultados del análisis de los isotipos del MAb E10. Para determinar el isotipo de E10, se llevó a cabo un análisis estándar usando anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgM, anti-LK, y anti-Lλ Fc humanos específicos, a fin de obtener el isotipo.

[0194] **Bioensayo de neutralización del GM-CSF.** Se cultivó la línea celular TF-1 de eritroleucemia humana, dependiente de GM-CSF humano (ATCC, Virginia, Estados Unidos), en RPMI 1640 completo (véase anteriormente) que contenía 10 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). El día anterior al experimento, se cultivaron células TF-1 en FBS (suero fetal bovino) al 0,5% en ausencia de GM-CSF. Las células TF-1 privadas se cosecharon y se lavaron dos veces con medio de ensayo (RPMI simple con BSA al 0,5%). Dichas células se resuspendieron en medio de ensayo y se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una concentración de 10000 células/pocillo. Los pocillos contenían medio de ensayo, 100 pg/ml de GM-CSF, o GM-CSF incubado previamente durante una hora con Igs de prueba o isotipo de control, a las concentraciones indicadas en la figura. Transcurridos 3 días, se añadieron 40 µl de reactivo Cell Titer (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) a cada pocillo, y se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en espectrofotómetro, y se restó de todas las muestras el "ruido de fondo" ("fondo") del medio. Se calculó el porcentaje de neutralización del GM-CSF, de la siguiente manera: $100 - [(D.O. \text{ con Ig} / D.O. \text{ sin Ig}) \times 100]$. En la Figura 4 se ilustra la inhibición del crecimiento, dependiente de GM-CSF, de las líneas celulares TF-1, con MABs completamente humanos.

[0195] **Inhibición de la reparación de discordancias a fin de incrementar la diversidad genética de las líneas celulares de hibridoma.** La inhibición de la reparación de discordancias puede tener como consecuencia células hermanas genéticamente diversas que muestran mayor producción, crecimiento celular o actividad anticuerpo. A fin de incrementar la actividad MAb y el crecimiento celular, se cultivaron células de hibridoma en RPMI completo (control negativo) o RPMI completo que contenía una concentración 250 µM o 500 µM del morfoceno (9,10-dimetilantraceno, MP Biomedicals, California, Estados Unidos) inhibidor de la reparación de discordancias. Se hicieron pasar las células, a una dilución 1:5 cada tres o cuatro días, por medio recién preparado, con o sin morfoceno; transcurridas tres semanas, las células se cosecharon y se resuspendieron a razón de 2×10^6 células/ml en tampón para FACS (PBS con BSA al 1%). Se tiñeron las células con 10 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-Ig humana conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch), durante 30 minutos, sobre hielo. Dichas células se lavaron con 10 ml de tampón para FACS helado, y se resuspendieron en 3 ml de tampón para FACS. Se añadieron 10 µl de VIAPROBE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos), durante 5 minutos, sobre hielo, y se clasificaron las células viables en función de una alta tinción de superficie con Ig, en un clasificador de células FACSARIA (Becton Dickinson). La condición (la "puerta lógica") se definió de manera que se seleccionasen las células que representaban el 5% de la subpoblación con la mayor tinción de superficie con Ig. Dicha población se expandió durante una semana, en presencia o ausencia del inhibidor químico de la reparación de discordancias (MMR), y el procedimiento se repitió dos veces adicionales. Para la selección de clones con concentraciones mayores, las células clasificadas mediante FACS se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en forma de U, a razón de 0,8 células/pocillo en 200 µl de RPMI completo, y se incubaron dichas placas durante una semana a 37 °C en CO₂ al 5%. Se cosecharon 50 µl de sobrenadantes de los pocillos y se analizó su producción de IgM mediante ELISA, usando placas recubiertas de anticuerpo de cabra anti-IgM+G humanas. Como control interno, se sembraron 3 pocillos de cada placa de ELISA con 50 µl de 10 ng/ml de IgM humana (Jackson ImmunoResearch). Los valores de D.O. obtenidos a 450 nm se normalizaron a los valores medios de los pocillos de control internos. Los pocillos que mostraban señales de IgM intensas se expandieron para análisis adicional. Para el análisis de la MSI, se extrajo ADN de células parentales o tratadas con inhibidor de la MMR, usando el kit DNeasy Tissue (Qiagen). El marcador de repeticiones poliA en BAT se amplificó usando los cebadores mBAT-26-F (5'-tcaccatccattgcacagtt-3') (SEC N.º ID: 20) y mBAT-26-R (5'-ctgctgagaaggtactcaccc-3') (SEC N.º ID: 21), marcados fluorescentemente con D4, y la polimerasa de alta fidelidad pfuUltra™ (Stratagene, California, Estados Unidos); las reacciones se incubaron de la siguiente manera: 5 minutos a 95 °C; 9 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 2 minutos a 72 °C, con la

temperatura de anillado disminuyendo 1 °C cada ciclo; 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 52 °C, y 2 minutos a 72 °C; extensión final de 10 minutos a 72 °C. Se obtuvieron copias únicas del alelo del marcador mediante el uso de una dilución de ADN que proporcionó un amplicón en sólo el 50% de las reacciones PCR. Los productos de la PCR se diluyeron 1:10 con una solución para carga de muestras CEQ, y luego se cargaron en el sistema de análisis genético Beckman CEQ 8000, para el análisis de los fragmentos. (Blake *et al.* Stepwise deletions of polyA sequences in mismatch repair-deficient colorectal cancers. (2001) *Am. J. Pathol.* 158:1867-70).

Ejemplo 3

Generación de anticuerpo monoclonal E10 con gran especificidad por el GM-CSF

[0196] Se obtuvieron varios anticuerpos de células B de pacientes con PAP. Dichos anticuerpos eran de los isotipos IgM e IgG. Usando los ensayos de determinación de la especificidad aquí descritos, se determinó que cada uno de dichos anticuerpos se unía específicamente al GM-CSF. A partir de células B de un paciente con proteinosis alveolar pulmonar (PAP), fusionadas con un tipo u otro tipo de células de mieloma, se generó un anticuerpo monoclonal IgG1 humano E10 anti-GM-CSF; después, se seleccionaron mediante ELISA anticuerpos monoclonales anti-GM-CSF humano, tal y como se ha descrito anteriormente.

[0197] Se usó sangre (91 ml de sangre entera) de un paciente con PAP, a fin de aislar un total de 49,5 millones de PBMCs. La viabilidad de dichas células fue del 99,0%. Los resultados de un análisis FACS que se llevó a cabo se muestran en la Tabla 2. Se expandieron las células B mediante cultivo de aproximadamente 25 millones de PBMCs en cRPMI1640 (10 ml) con 2 ng/ml de IL-4 (PeproTech), 50 µg/ml de transferrina (Sigma), 5 ng/ml de PMA (Sigma), 0,5 µg/ml de ciclosporina A (Sigma), con células alimentadoras. Tras 11 días de cultivo, quedaron 12 millones de células, y después, dichas células se fusionaron con una célula de mieloma mediante electrofusión (CytoPulse CEEF-50). Los resultados del análisis FACS que se llevó a cabo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Generación de anticuerpo monoclonal E10, y análisis FACS

	FITC-CD3(%)	FITC-CD20(%)	PE-GMCSF(%)	CD20/GMCSF
PBMC	62,6	14,4	5,9	6,3
Cultivo de 11 días	77,2	17,0	0,7	0,1

[0198] Las células fusionadas se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen, California, Estados Unidos) con FBS al 10%, inactivado por el calor (JRH Biosciences, Kansas, Estados Unidos); L-glutamina, 200 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); aminoácidos no esenciales, 10 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); solución de piruvato sódico, 100 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); Pen-Strep (Invitrogen, California, Estados Unidos); 2-mercaptoetanol, 55 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); y 1x HAT (Sigma, Misuri, Estados Unidos).

[0199] Tras cultivo durante 12 días, alrededor del 48% del cultivo de hibridoma mostró crecimiento. Después, se analizaron los hibridomas mediante un ensayo ELISA específico de GM-CSF, con GM-CSF recombinante (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). Se aislaron varios clones, incluidos los positivos a GM-CSF. Dichos clones se volvieron a analizar mediante ELISA para confirmar que eran específicos del GM-CSF recombinante y no de la toxina tetánica (TT). El clon 4E10 mostró reacción específica con el GM-CSF, y no con la TT. Después, se subclonó el clon 4E10. Transcurridas 3 semanas, los subclones cultivados se analizaron mediante ELISA a fin de confirmar que mantenían la especificidad por el GM-CSF, y se caracterizaron más, conforme a como se describe a continuación.

[0200] **Caracterización del E10.** A fin de determinar la especificidad de los anticuerpos E10 anti-GM-CSF, se llevó a cabo un ensayo ELISA específico de antígeno, con una diversidad de antígenos (Figura 8). En la Figura 8 se compara la unión a los siguientes antígenos: hIL-1a, h IL-2, h IL-3, h IL-4, h IL-5, IL-6, h IL-13, hGM-CSF, mGM-CSF, BSA, y TT. En estudios subsiguientes, se comparó la unión de los anticuerpos anti-GM-CSF con: GM-CSF humano, mesotelina humana, SEB, BGG, CAB, HEL, TT, BSA, IgG de cabra, mucina humana e IgG murina (no se muestran los datos). En ambos estudios, el 4E10 reaccionó únicamente con el GM-CSF humano.

[0201] Para determinar el isotipo del E10 se llevó a cabo un análisis estándar usando anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgM, anti-LK, y anti-Lλ Fc humanos, a fin de obtener el isotipo. Dicho análisis demostró que el 4E10 es un anticuerpo IgG1 y Kappa (véase la Figura 9).

[0202] La capacidad del E10 para neutralizar la actividad biológica del GM-CSF *in vitro* se sometió a prueba usando una línea celular, TF-1, dependiente de dicha citoquina (GM-CSF) para su supervivencia y crecimiento (véase la Figura 8). Se cultivó la línea celular TF-1 de eritroleucemia humana, dependiente de GM-CSF humano (ATCC, Virginia, Estados Unidos), en medio RPMI 1640 completo que contenía 10 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). El día anterior al experimento, se cultivaron células TF-1 en FBS al 0,1% en ausencia de GM-CSF. Las células TF-1 deprivadas se cosecharon y se lavaron dos veces con medio de ensayo (RPMI simple con BSA al 0,5%). Dichas células se suspendieron en medio de ensayo y se

sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una concentración de 10000 células/pocillo. Los pocillos contenían medio de ensayo, 100 pg/ml de GM-CSF, o GM-CSF incubado previamente durante una hora con las Igs de la prueba o isotipo de control, a concentraciones que iban desde 20 µg/ml hasta 0,315 µg/ml. Transcurridos 3 días, se añadieron 40 µl de reactivo CELL TITER (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) a cada pocillo, y se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en espectrofotómetro, y se restó de todas las muestras el “ruido de fondo” (“fondo”) del medio. Se calculó el porcentaje de neutralización del GM-CSF, de la siguiente manera: $100 - [(D.O. \text{ con Ig} / D.O. \text{ sin Ig}) \times 100]$. El anticuerpo 4E10 fue capaz de neutralizar la actividad del GM-CSF *in vitro*, a una concentración de 100 pg/ml.

[0203] Se llevó a cabo un análisis “Western blot” (electroinmunotransferencia Western) con el E10 a fin de determinar si podía existir una reacción cruzada entre dicho anticuerpo y el GM-CSF recombinante humano. Como se ilustra en la Figura 10, el E10 reacciona de forma cruzada con el GM-CSF humano, en condiciones reductoras.

[0204] A fin de determinar la afinidad de unión del E10, se llevó a cabo un análisis con BIACORE, como se indica a continuación. La constante de unión del E10 está en torno a 870 pM (Figura 11).

Ejemplo 4

Generación de anticuerpo monoclonal G9 con alta especificidad por el GM-CSF

[0205] A partir de células B de un paciente con proteinosis alveolar pulmonar (PAP), fusionadas con células K6 o con células CBF-7, se generó un anticuerpo monoclonal IgG1 humano G9 anti-GM-CSF; después, se seleccionaron mediante ELISA anticuerpos monoclonales anti-GM-CSF humano, tal y como se ha descrito anteriormente.

[0206] Se usó sangre (91 ml de sangre entera) de un paciente con PAP, a fin de aislar un total de 49,5 millones de PBMCs. La viabilidad de dichas células fue del 99,0% (no se muestran los datos). Se expandieron las células B mediante cultivo de aproximadamente 25 millones de PBMCs en cRPMI1640 (10 ml) con 2 ng/ml de IL-4 (PeproTech), 50 µg/ml de transferrina (Sigma), 5 ng/ml de PMA (Sigma), 0,5 µg/ml de ciclosporina A (Sigma), con células alimentadoras. Tras 11 días de cultivo, quedaron 12 millones de células, y después, dichas células se fusionaron con células de mieloma mediante electrofusión (CytoPulse CEEF-50).

[0207] Las células fusionadas se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen, California, Estados Unidos) con FBS al 10%, inactivado por el calor (JRH Biosciences, Kansas, Estados Unidos); L-glutamina, 200 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); aminoácidos no esenciales, 10 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); solución de piruvato sódico, 100 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); Pen-Strep (Invitrogen, California, Estados Unidos); 2-mercaptoetanol, 55 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos); y 1x HAT (Sigma, Misuri, Estados Unidos).

[0208] Tras cultivo durante 12 días, alrededor del 48% del cultivo de hibridoma mostró crecimiento. Después, se analizaron los hibridomas mediante un ensayo ELISA específico de GM-CSF, con GM-CSF recombinante (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). Se aislaron varios clones, incluidos los positivos a GM-CSF. Dichos clones se volvieron a analizar mediante ELISA para confirmar que eran específicos del GM-CSF recombinante y no de la toxina tetánica (TT). La población G9 mostró una reactividad altamente específica con el GM-CSF, y no con la TT. Después, se subclonó la población G9, a fin de obtener un cultivo puro. Transcurridas 3 semanas, los subclones cultivados se analizaron mediante ELISA a fin de confirmar que mantenían la especificidad por el GM-CSF, y se caracterizaron más, conforme a como se describe a continuación.

[0209] **Caracterización del G9.** A fin de determinar la especificidad de los anticuerpos G9 anti-GM-CSF, se llevó a cabo un ensayo ELISA específico de antígeno, con una diversidad de antígenos (Figura 8). En la Figura 8 se compara la unión a los siguientes antígenos: hIL-1a, h IL-2, h IL-3, h IL-4, h IL-5, IL-6, h IL-13, hGM-CSF, mGM-CSF, BSA, y TT. En estudios subsiguientes, se comparó la unión de los anticuerpos anti-GM-CSF con: GM-CSF humano, mesotelina humana, SEB, BGG, CAB, HEL, TT, BSA, IgG de cabra, mucina humana e IgG murina (no se muestran los datos). En ambos estudios, el G9 reaccionó únicamente con el GM-CSF humano.

[0210] Para determinar el isotipo del G9, se llevó a cabo un análisis estándar usando anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgM, anti-L_K, y anti-L_λ humanos, a fin de obtener el isotipo. Dicho análisis demostró que el G9 es un anticuerpo IgG1 y Kappa (Figura 12).

[0211] **Bioensayo de neutralización por parte del G9.** La capacidad del G9 para neutralizar la actividad biológica del GM-CSF *in vitro* se sometió a prueba usando una línea celular, TF-1, dependiente de dicha citoquina (GM-CSF) para su supervivencia y crecimiento (Figura 4). Se cultivó la línea celular TF-1 de eritroleucemia humana, dependiente de GM-CSF humano (ATCC, Virginia, Estados Unidos), en RPMI 1640 completo que contenía 10 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (PeproTech, Nueva Jersey, Estados Unidos). El día anterior al experimento, se cultivaron células TF-1 en FBS al 0,1% en ausencia de GM-CSF. Las células TF-1 privadas se cosecharon y se lavaron dos veces con medio de ensayo (RPMI simple con BSA al 0,5%). Dichas células se suspendieron en medio de ensayo y se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una concentración de 10000 células/pocillo. Los pocillos contenían medio de ensayo, 100 pg/ml de GM-CSF, o GM-CSF incubado previamente durante una hora con las Igs

de prueba o isotipo de control, a concentraciones que iban desde 20 µg/ml hasta 0,315 µg/ml. Transcurridos 3 días, se añadieron 40 µl de reactivo CELL TITER (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) a cada pocillo, y se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 490 nm en espectrofotómetro, y se restó de todas las muestras el "ruido de fondo" ("fondo") del medio. Se calculó el porcentaje de neutralización del GM-CSF, de la siguiente manera: $100 - [(D.O. \text{ con Ig} / D.O. \text{ sin Ig}) \times 100]$. El anticuerpo G9 fue capaz de neutralizar la actividad del GM-CSF *in vitro*, a una concentración de 100 pg/ml.

[0212] Se llevó a cabo un análisis "Western blot" (electroinmunotransferencia Western) con el G9 a fin de determinar si podía existir una reacción cruzada entre dicho anticuerpo y el GM-CSF recombinante humano. Como se ilustra en la Figura 10, el G9 reacciona de forma cruzada con el GM-CSF humano, en condiciones reductoras.

[0213] A fin de determinar la afinidad de unión del G9, se llevó a cabo un análisis con BIACORE, de la manera ya descrita. La constante de unión del G9 está en torno a 11-17 pM (Figura 13).

Ejemplo 5

Secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos plenamente humanos G9 y E10 anti-GM-CSF

[0214] *Anticuerpo G9.* Se obtuvieron, mediante métodos estándar, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes al anticuerpo G9, plenamente humano, anti-GM-CSF. Descrito brevemente, se aisló ARN total de células de hibridoma G9, usando el reactivo Trizol (Invitrogen) conforme a las instrucciones del fabricante. El mensaje se sintetizó a ADNc, usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), conforme a las instrucciones del fabricante. A fin de amplificar las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada, se llevaron a cabo reacciones de PCR mediante la ADN polimerasa Herculase (Stratagene), usando los cebadores con las SEC N.º ID: 22 y 23 para la cadena ligera, y con las SEC N.º ID: 24 y 25 para la cadena pesada. Los productos de la PCR se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen), que se transformó en células Mach1 de *E. coli*, y las células transformadas se seleccionaron en placas con medio LB y kanamicina. Se analizaron y seleccionaron las colonias que presentaban insertos con las parejas de cebadores indicadas, y se usaron cuatro colonias positivas a cada pareja a fin de generar un ADN plantilla para la determinación de la secuencia de ADN, usando el reactivo TempliPhi (GE Healthcare). Los insertos de ADN se secuenciaron con los cebadores de SEC N.º ID: 26 y SEC N.º ID: 27, usando el reactivo DTCS de secuenciación en Beckman Coulter; después, se adquirieron y analizaron los datos en un Beckman Coulter CEQ2000. A fin de añadir una secuencia peptídica líder a la cadena ligera, se reamplificó un clon positivo con los cebadores de SEC N.º ID: 28 y SEC N.º ID: 23, usando la ADN polimerasa Herculase. A fin de generar una cadena pesada de longitud completa (SEC N.º ID: 11) que incluyese una secuencia peptídica líder, se llevó a cabo PCR con los cebadores de SEC N.º ID: 29 y SEC N.º ID: 30, usando el ADNc original como plantilla. El producto resultante de la PCR se sometió a clonación TA, se transformó en células Mach1, y los clones positivos se identificaron de la manera descrita anteriormente. Se secuenció el ADNc de la cadena pesada de longitud completa del G9, con los cebadores de SEC N.º ID: 25, de SEC N.º ID: 26, de SEC N.º ID: 31, de SEC N.º ID: 32, de SEC N.º ID: 33, de SEC N.º ID: 34, de SEC N.º ID: 27 y de SEC N.º ID: 30, usando el ADN plantilla generado mediante el reactivo TempliPhi. Más adelante en la sección de lista de secuencias de este documento se muestran las secuencias de ADN resultantes, correspondientes a la cadena pesada de longitud completa del G9 (SEC N.º ID: 11) y a la cadena ligera de longitud completa del G9 (SEC N.º ID: 15). Los productos de la traducción previstos, derivados de la SEC N.º ID: 11 y de la SEC N.º ID: 15, se muestran en la SEC N.º ID: 9 y en la SEC N.º ID: 13, respectivamente. Los productos de la traducción previstos, derivados de la SEC N.º ID: 10 y de la SEC N.º ID: 14, se muestran en la SEC N.º ID: 8 y en la SEC N.º ID: 12, respectivamente. Las secuencias subrayadas de las SEC N.º ID: 11 y 15 representan la secuencia líder añadida mediante PCR. Las secuencias de polinucleótidos de las SEC N.º ID: 10 y 14 codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo G9, respectivamente, sin las secuencias líder añadidas. Las secuencias que se muestran en minúsculas, de las SEC N.º ID: 9 y 13 representan los péptidos líder humanos añadidos mediante la reacción PCR. Las secuencias subrayadas de las SEC N.º ID: 8, 9, 12, y 13 representan las regiones CDR. Las secuencias restantes, de SEC N.º ID: 8, 9, 12 y 13 son las regiones de andamiaje ("framework", FWR) de las regiones variables y de las regiones constantes. La región constante de la cadena pesada comienza con una secuencia de aminoácidos WGQG (aminoácido 111 de la SEC N.º ID: 8, o aminoácido 130 de la SEC N.º ID: 9), y la región constante de la cadena ligera comienza con una secuencia de aminoácidos FGQG (aminoácido 98 de la SEC N.º ID: 12, o aminoácido 117 de la SEC N.º ID: 13).

[0215] *Anticuerpo E10.* Se obtuvieron, mediante métodos estándar, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondientes al anticuerpo E10, plenamente humano, anti-GM-CSF. Descrito brevemente, se aisló ARN total de células de hibridoma E10, usando el reactivo Trizol (Invitrogen) conforme a las instrucciones del fabricante. El mensaje se sintetizó a ADNc, usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), conforme a las instrucciones del fabricante. A fin de amplificar las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada, se llevaron a cabo reacciones de PCR mediante la ADN polimerasa Herculase (Stratagene), usando los cebadores con las SEC N.º ID: 22 y 23 para la cadena ligera, y con las SEC N.º ID: 24 y 25 para la cadena pesada. Los productos de la PCR se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen), que se transformó en células Mach1 de *E. coli*, y las células transformadas se seleccionaron en placas con medio LB y kanamicina. Se analizaron y seleccionaron las colonias que presentaban insertos con las parejas de cebadores indicadas, y se usaron cuatro colonias positivas a cada pareja a fin de generar un ADN plantilla para la determinación de la secuencia de ADN, usando el reactivo

TempliPhi (GE Healthcare). Los insertos de ADN se secuenciaron con los cebadores de SEC N.º ID: 26 y SEC N.º ID: 27, usando el reactivo DTCS de secuenciación en Beckman Coulter; después, se adquirieron y analizaron los datos en un Beckman Coulter CEQ2000. Más adelante en la sección de lista de secuencias de este documento se muestran las secuencias de ADN resultantes, que codifican la región variable de la cadena pesada del E10 (SEC N.º ID: 17) y la cadena ligera de longitud completa del E10 (SEC N.º ID: 19). Los productos de la traducción previstos, derivados de la SEC N.º ID: 17 y de la SEC N.º ID: 19, se muestran en la SEC N.º ID: 16 y en la SEC N.º ID: 18, respectivamente. Las secuencias subrayadas de las SEC N.º ID: 16 y 18 representan las regiones CDR. Las secuencias restantes de las SEC N.º ID: 16 y 18 son la región de andamiaje ("framework", FWR) de la región variable y de las regiones constantes. La región constante de la cadena pesada comienza con una secuencia de aminoácidos WGQG (aminoácido 115 de la SEC N.º ID: 16), y la región constante de la cadena ligera comienza con una secuencia de aminoácidos FGQG (aminoácido 98 de la SEC N.º ID: 18).

Ejemplo 6

Mapeado del epítipo del anticuerpo anti-GM-CSF

[0216] A fin de mapear el epítipo del GM-CSF al que se une el anticuerpo G9, se generó una serie de péptidos solapados que abarcan la longitud del GM-CSF humano (Figura 14). Descrito brevemente, se diseñaron veinticinco péptidos de 12-meros solapados, que engloban la secuencia del GM-CSF humano (N.º de acceso AAA52578 en GenBank, residuos del 14 al 144), de manera que contuviesen 7 solapamientos de aminoácidos. Los péptidos se generaron de modo tal que formaron puntos individuales de 3,7 mm x 3,7 mm, mediante síntesis en fase sólida a través de acoplamiento del extremo carboxiterminal de cada péptido a la superficie de una membrana de celulosa derivada (tecnología SPOTs, Sigma Genosys). Para determinar qué péptidos reaccionan (mediante reacciones cruzadas) con el G9, se empleó un análisis Western blot (electroinmunotransferencia Western) estándar (Figura 15). La membrana de celulosa se humedeció en metanol y se bloqueó en solución de bloqueo (BSA al 5%, 1X TBS, Tween-20 al 0,1%, NaN₃ al 0,1%), durante toda la noche a 4 °C. Se añadió solución de bloqueo recién preparada que contenía 1 mg/ml de anticuerpo 10G9 purificado, y el "blot" (la electroinmunotransferencia) se incubó durante toda la noche a 4 °C. El blot se lavó tres veces (5 minutos cada vez) en TBS-T (1X TBS, Tween-20 al 0,1%), y se incubó durante una hora en una dilución 1:10000 de anticuerpo de cabra anti-IgG(H+L) humana conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, N.º de catálogo 109-035-088), en diluyente (BSA al 5%, 1X TBS, Tween-20 al 0,1%). Dicho blot se reveló usando el kit "SuperSignal West Femto ECL Substrate Kit" (Pierce, N.º de catálogo 34095), y después, efectuando una segunda exposición del blot, a película BioMAX (Kodak). Mediante este método, los péptidos N.º 6, 13, 14, 15, y posiblemente el péptido N.º 23, fueron reconocidos de manera específica por el anticuerpo G9; dichos péptidos se corresponden con las SEC N.º ID: 18, 19, 20, 21, y 47, respectivamente.

[0217] La presente invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas anteriormente, sino que puede ser objeto de variaciones y de modificaciones de conformidad con las reivindicaciones adjuntas y dentro del ámbito de éstas.

Lista de Secuencias

SEC N.º ID:1:

MWLQSLLLLGTVACSI SAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMF
DLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQIITFESFKENLK
DFLLVIPFDCWEPVQE

SEC N.º ID:2:

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQ
GLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

SEC N.º ID:3: EHVNAIQEARLLNL

SEC N.º ID:4: STQPWEHVNAIQEAR

SEC N.º ID:5: MASHYKQHCPPTPET

SEC N.º ID:6: LSTAVKELVENS LDAGATNIDLKLDYGVDLIEVSDNGCGVEEENFE

SEC N.º ID:7: LRQVLSNLLDNAIKYTPEGGEITVSLERDGDHLEITVEDNGPGIPEEDLE

SEC N.º ID:8: Secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del G9

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHWHWLRQVPGKGPVWVSRINGAGTSITYADSV
RGRFTISRDNANNTLFLQMNSLRADDTALYFCARANSVWFRGLFDYWGQGTPVTVSSASTKGPS

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
 ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK*

SEC N.º ID:9: Secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del G9 (con secuencia líder)

mgwsciilflvatatgvhsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHWMHWRQVPGKGP
VWVSRINGAGTSLITYADSVRGRFTISRDNANNTLFLQMNSLRADDTALYFCARANSVWFRGLFD
YWGQGTPTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEC N.º ID:10: Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena pesada del G9

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT
 GTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGACACTGGATGCACTGGCTTCGCCAGGTTCCAGGTAA
 GGGGCCGGTCTGGGTCTCACGTATCAATGGTGTGGGACTTCCATAACCTACCGGACTCCGTG
 AGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAACAACACACTGTTTCTGCAAATGAACAGTC
 TGAGAGCCGACGACACGGCTCTTTATTTCTGTGCAAGAGCGAACAGCGTCTGGTTCGGGGCCT
 CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
 GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGC
 ACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATG
 ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
 GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA

AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCCGGAAATGA

SEC N.º ID:11: Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena pesada del G9 (con secuencia líder)

aagcttgccgccaccATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTG
TACACAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCGGGGGGTCCCTGAG
ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGACACTGGATGCACTGGCTTCGCCAGGTT
CCAGGTAAGGGGCCGGTCTGGGTCTCACGTATCAATGGTGCTGGGACTTCCATAACCTACGGG
ACTCCGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAACAACACACTGTTTCTGCAAAT
GAACAGTCTGAGAGCCGACGACACGGCTCTTTATTTCTGTGCAAGAGCGAACAGCGTCTGGTTC
CGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG
GCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC
AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG
TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCCGGAAATGagaattc

SEC N.º ID:12: Secuencia de aminoácidos prevista de la cadena ligera del G9

EIVLTQSPVTLVSPGERVTLSCRASQSVSTNLAWYQQKLGQGPRLLIYGASTRATDIPARFSG
SGSETEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYDKWPDTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

**SEC N.º ID:13: Secuencia de aminoácidos prevista de la cadena
ligera del G9 (con secuencia líder)**

mgwsciilflvatatgvhsEIVLTQSPVTLSPGERVTLSCRASQSVSTNLAWYQQKLGQGPR
LLIYGASTRATDIPARFSGSGSETEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDKWPDITFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

**SEC N.º ID:14: Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena
ligera del G9**

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGTCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACTCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCACCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAACTTGGCCAGGG
TCCCAGGCTCCTCATTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGATATCCCAGCCAGGTTCACTGGC
AGTGGGTCTGAGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTT
ATTACTGTCAGCAATATGATAAGTGGCCGGACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
GTAA

**SEC N.º ID:15: Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena
ligera del G9 (con secuencia líder)**

aagcttgccgccaccATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTG
TACACAGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGTCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGT
CACTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCACCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAACTT
GGCCAGGGTCCCAGGCTCCTCATTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGATATCCCAGCCAGGT
TCAGTGGCAGTGGGTCTGAGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTT
TGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATGATAAGTGGCCGGACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG
GAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA

AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG
GGGAGAGTGTTAAgaattc

SEC N.º ID:16: Secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada del E10

QVQLEESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTNYGMHWVRQAPGKGLEWLALISYDGNRQYYADSV
KGRFTVSRDNPNTLHLEMKSLRAEDSAIYYCARGAVLLWFGDLSWFDPWGQGLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD

SEC N.º ID:17: Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena pesada del E10

CAGGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTCAGACTCTCCT
GTGCAGCGTCTGGATTACCTTCACTAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGACTCGAGTGGCTGGCACTCATATCCTATGATGGAAATAGGCAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAATCCCAACAACACACTGCATCTGGAGATGAAGAGCC
TGCGAGCCGAAGACTCGGCTATATATTACTGTGCGAGAGGGGCTGGGGTATTACTGTGGTTCCGG
CGACTTATCCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCCCT
GACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGAC

SEC N.º ID:18: Secuencia de aminoácidos prevista de la cadena ligera del E10

DIQMTQSPSNLSASVGRVTITCRASQNINTWLAWYQHKPGKPKLRIYQASTLESGVPSRFSG
SGSGTIFTLTISLQPDDFGTYYCQNNSYFYTFQGKLEINRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSMDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC N.º ID:19: Secuencia de ácidos nucleicos de la cadena ligera del E10

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAACCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACAATCA
CTTGTCGGGCCAGTCAAAATATTAATACCTGGCTGGCCTGGTATCAGCACAAACCAGGGAAACC
CCCTAAGCTCCGGATATATCAGGCGTCTACGTTAGAAAGTGGGGTCCCTTCAAGGTTTACGCGC
AGTGGATCTGGGACGATATTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGAACTT
ATTACTGCCAACAGAATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
CCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA

ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCATGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
GTAA

SEC N.° ID:20: TCACCATCCATTGCACAGTT

SEC N.° ID:21: CTGCGAGAAGGTACTIONCACCC

SEC N.° ID:22: GAHRTYSWGHTGACBCAGTCTCC

SEC N.° ID:23:

GATCGAATTCTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCC

SEC N.° ID:24: AGGTRCAGCTGBWGSAGTCDG

SEC N.° ID:25: GTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTT

SEC N.° ID:26: AGCGGATAACAATTCACACAGG

SEC N.° ID:27: CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

SEC N.° ID:28:

GATCGGATCCGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACA
GGGTIACACAGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC

SEC N.° ID:29: GATCGAATTCTCATTCCCGGGAGACAGGGAGAGG

SEC N.° ID:30:

GATCGGATCCAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACA
GCTACAGGTGTACACAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

SEC N.° ID:31: GGACAAGAAAGTTGAGCCCA

SEC N.° ID:32: TGCAAGGTCTCCAACAAAGC

SEC N.° ID:33: CCTGGTTCTTGGTCAGCTCA
 SEC N.° ID:34: GGCACGGTGGGCATGTGTGA
 SEC N.° ID:35: ARRLNLSRDTA
 SEC N.° ID:36: TRLELYKQGLRG
 SEC N.° ID:37: YKQGLRGS�TKL
 SEC N.° ID:38: RGS�TKLKGPLT
 SEC N.° ID:39: KENLKDFLLVIP
 SEC N.° ID:40: (CDR1 H G9) GFTFSRHWMH
 SEC N.° ID:41: (CDR2 H G9) RINGAGTSITYADSVRG
 SEC N.° ID:42: (CDR3 H G9) ANSVWFRGLFDY
 SEC N.° ID:43: (CDR1 L G9) RASQSVSTNLA
 SEC N.° ID:44: (CDR2 L G9) GASTRAT
 SEC N.° ID:45: (CDR3 L G9) QQYDKWPDТ
 SEC N.° ID:46: (CDR1 H E10) GFTFTNYGMH
 SEC N.° ID:47: (CDR2 H E10) LISYDGNRQYYADSVKG
 SEC N.° ID:48: (CDR3 H E10) GAGVLLWFGDLSWFDР
 SEC N.° ID:49: (CDR1 L E10) RASQNINTWLA
 SEC N.° ID:50: (CDR2 L E10) QASTLES
 SEC N.° ID:51: (CDR3 L E10) QQNNSYPYT
 SEC N.° ID:52: (FWR1 H G9) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 SEC N.° ID:53: (FWR2 H G9) WLRQVPGKGPVWVS
 SEC N.° ID:54: (FWR3 H G9) RFTISRDNANNTLFLQMNSLRADDTALYFCAR
 SEC N.° ID:55: (FWR1 L G9) EIVLTQSPVTLSPGERVTLSC
 SEC N.° ID:56: (FWR2 L G9) WYQQKLGQGPRLLIY
 SEC N.° ID:57: (FWR3 L G9) DIPARFSGSGSETEFTLTISSLQSEDFAVYYC
 SEC N.° ID:58: (FWR1 H E10) QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
 SEC N.° ID:59: (FWR2 H E10) WVRQAPGKGLEWLA
 SEC N.° ID:60: (FWR3 H E10) RFTVSRDNPNTLHLEMKSLRAEDSAIYYCAR
 SEC N.° ID:61: (FWR1 L E10) DIQMTQSPSNLSASVGDRTITC
 SEC N.° ID:62: (FWR2 L E10) WYQHKGKPKPKLRIY
 SEC N.° ID:63: (FWR3 L E10) GVPSRFSGSGGTIFTLTISSLQPDDFGTYYC

Lista de secuencias
[0195]

5 <110> Sass, Phillip M. Nicolaides, Nicholas C. Grasso, Luigi Li, Jian Chao, Qimin Routhier,
Eric Ebel, Wolfgang

<120> PÉPTIDOS GM-CSF ANTIGÉNICOS Y ANTICUERPOS ANTI-GM-CSF

<130> MOR-0688

10 <150> US 60/774,500
<151> 2006-02-17

<150> US 60/771,251
15 <151> 2006-02-08

<160> 86

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
<211> 144
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 1
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10
Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
20 25 30
Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
35 40 45
Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
50 55 60
Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
65 70 75 80
Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
85 90 95
Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
100 105 110
30 Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys

ES 2 609 088 T3

115 120 125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 130 135 140

<210> 2

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Constructo sintético

<400> 2

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

<210> 3

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Constructo sintético

<400> 3

Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu
 1 5 10 15

<210> 4

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 4

5 Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15 <400> 5

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr
1 5 10 15

<210> 6

<211> 47

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 6

Leu Ser Thr Ala Val Lys Glu Leu Val Glu Asn Ser Leu Asp Ala Gly
1 5 10 15

Ala Thr Asn Ile Asp Leu Lys Leu Lys Asp Tyr Gly Val Asp Leu Ile
20 25 30

Glu Val Ser Asp Asn Gly Cys Gly Val Glu Glu Glu Asn Phe Glu
35 40 45

<210> 7

<211> 50

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

35 <400> 7

Leu Arg Gln Val Leu Ser Asn Leu Leu Asp Asn Ala Ile Lys Tyr Thr
1 5 10 15

ES 2 609 088 T3

Pro Glu Gly Gly Glu Ile Thr Val Ser Leu Glu Arg Asp Gly Asp His
 20 25 30

Leu Glu Ile Thr Val Glu Asp Asn Gly Pro Gly Ile Pro Glu Glu Asp
 35 40 45

Leu Glu
 50

<210> 8

<211> 451

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg His
 20 25 30

Trp Met His Trp Leu Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Pro Val Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Asn Gly Ala Gly Thr Ser Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Asn Ser Val Trp Phe Arg Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

ES 2 609 088 T3

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

5

<210> 9

<211> 470

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Arg His Trp Met His Trp Leu Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Pro
 50 55 60

Val Trp Val Ser Arg Ile Asn Gly Ala Gly Thr Ser Ile Thr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn
 85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Asn Ser Val Trp Phe Arg Gly Leu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

5

ES 2 609 088 T3

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

5

<210> 10
 <211> 1356
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido cebador

5

<400> 10

```

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagttcagc cgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agacactgga tgcactggct tcgccagggt      120
ccaggaagg gggcggctctg ggtctcacgt atcaatggtg ctgggacttc cataacctac      180
gcggactccg tgaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaacaa cacactgttt      240
ctgcaaatga acagtctgag agccgacgac acggctcttt atttctgtgc aagagcgaac      300
agcgtctggt tccggggcct ctttgactac tggggccagg gaaccccggt caccgtctcc      360
tcagctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc      540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg      720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      780
cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac      900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc     1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat     1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcag     1140

atcgcctggt agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc     1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1320
acgcagaaga gcctctccct gtctcccggg aatga                                     1356
    
```

10

<210> 11

<211> 1434

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido cebador

<400> 11

ES 2 609 088 T3

```

aagcttgccg ccaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc aacagctaca 60
ggtgtacaca gcgaggtgca gctggtggag tctgggggag gcttagttca gccggggggg 120
tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtagacactg gatgcaactg 180
cttcgccagg ttccaggtaa ggggccggtc tgggtctcac gtatcaatgg tgctgggact 240
tccataacct acgcggactc cgtgaggggc cgattcacca tctccagaga caacgccaac 300
aacacactgt ttctgcaaat gaacagtctg agagccgacg acacggctct ttatttctgt 360
gcaagagcga acagcgtctg gttccggggc ctctttgact actggggcca ggaacccccg 420
gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggctt tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgctcgtgaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaactg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720
aagaaagttg agcccaaac ttgtgacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct 780
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 840
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 900
gtcaagttca actggtactg ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 960
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 1020
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc 1080
gagaaaacca tctccaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1200
tatcccagcg acatcgcctg ggagtgaggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1320

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctcccg ggaatgaga attc 1434

```

5 <210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 12

ES 2 609 088 T3

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

5 <210> 13

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 13

ES 2 609 088 T3

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

5

<210> 14
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido cebador
<400> 14

ES 2 609 088 T3

gaaattgtgc tgactcagtc tccagtcacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagtcact 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc accaacttag cctggtatca gcagaaactt 120
 gggcagggc ccaggctcct catttatggt gcatccacca gggccactga tatcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgagacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttg cagttatta ctgtcagcaa tatgataagt ggccggacac ttttgccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagttcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 645

<210> 15

<211> 723

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido cebador

<400> 15

aagcttgccg ccaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc aacagctaca 60
 ggtgtacaca gcgaaattgt gctgactcag tctccagtc ccctgtctgt gtctccaggg 120
 gaaagagtca ctctctcctg cagggccagt cagagtgtta gcaccaactt agcctggtat 180
 cagcagaaac ttggccaggg tcccaggctc ctcatttatg gtgcatccac cagggccact 240

 gatatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgagacag agttcactct caccatcagc 300
 agcctgcagt ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc aatatgataa gtggccggac 360
 acttttgcc aggggaccaa gctggagatc aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 420
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcaagtc 660
 acccatcagg gcctgagttc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaagaa 720
 ttc 723

<210> 16

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 16

ES 2 609 088 T3

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

5 <210> 17
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 17

ES 2 609 088 T3

```
caggtacagc tggaggagtc agggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctcagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcact aattatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg gactcgagtg gctggcactc atatactatg atggaaatag gcaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca atcccaaca cacactgcat 240
ctggagatga agagcctgcg agccgaagac tcggctatat attactgtgc gagaggggct 300
ggggatttac tgtggttcgg cgacttatcc tggttcgacc cctggggcca gggaaacctg 360
gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcgggtt tccccctggc accctcctcc 420
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
```

<210> 18

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

5

ES 2 609 088 T3

<400> 18

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

<210> 19

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido cebador

<400> 19

ES 2 609 088 T3

```

gatatccaga tgaccagtc tccttccaac ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcaca    60
atcacttgtc gggccagtca aaatattaat acctggctgg cctggatca gcacaaacca    120
gggaaacccc ctaagctccg gatatatcag gcgtctacgt tagaaagtgg ggtcccttca    180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacgata ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct    240
gatgattttg gaacttatta ctgccaacag aataatagtt acccgtagac ttttggccag    300
gggaccaagc tggagatcaa ccgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgccca    360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat    420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag    480
gagagtgtca cagagcagga cagcatggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg    540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc    600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa                    645

```

```

5  <210> 20
   <211> 20
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> Oligonucleótido cebador

   <400> 20
   tcaccatcca ttgcacagtt          20

15 <210> 21
   <211> 20
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

20 <220>
   <223> Oligonucleótido cebador

   <400> 21
   ctgcgagaag gtactcacc          20

25 <210> 22
   <211> 23
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

30 <220>
   <223> Constructo sintético

   <400> 22
       Gly Ala His Arg Thr Tyr Ser Trp Gly His Thr Gly Ala Cys Asx Cys
       1           5           10           15
35

```

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys
20

5 <210> 23
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 23
 gatcgaattc ttaacctct ccctgttga agctcttgt gacgggag ctcaggcc 58

15 <210> 24
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 24
 Ala Gly Gly Thr Arg Cys Ala Gly Cys Thr Gly Asx Trp Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Asp Gly
 20

25 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 25
 gtccaccttg gtgttgctgg gctt 24

35 <210> 26
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 26

	agcggataac aatttcacac agg	23	
5	<210> 27 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido cebador		
	<400> 27 cgccagggtt ttccagtcg cgac	24	
15	<210> 28 <211> 99 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido cebador		
	<400> 28 gatcggatcc gccgccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc	60	
	tacagtgta cacagcgaag ttgtgctgac tcagtctcc	99	
25	<210> 29 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido cebador		
35	<400> 29 gatcgaattc tcatttcccg ggagacaggg agagg	35	
40	<210> 30 <211> 105 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Oligonucleótido cebador		
45	<400> 30 gatcggatcc aagcttgccg ccaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc	60	
	aacagctaca ggtgtacaca gcgaggtgca gctggtggag tctgg	105	

5 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido cebador

10 <400> 31
 ggacaagaaa gttgagccca 20

15 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 32
 tgcaaggtct ccaacaaagc 20

25 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 33
 cctggttctt ggtcagctca 20

35 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido cebador

45 <400> 34
 ggcacggtgg gcatgtgtga 20

<210> 35

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 35
 Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala
 1 5 10

10

<210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 36
 Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly
 1 5 10

20

<210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 37
 Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu
 1 5 10

30

<210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Constructo sintético

40

<400> 38
 Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr
 1 5 10

45

<210> 39
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> Constructo sintético

<400> 39
 Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro
 1 5 10

10 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 40
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg His Trp Met His
 1 5 10

20 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 41
 Arg Ile Asn Gly Ala Gly Thr Ser Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15

30 Gly

<210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Constructo sintético

40 <400> 42
 Ala Asn Ser Val Trp Phe Arg Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 43

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 43
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Asn Leu Ala
 1 5 10

10

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 44
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

20

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 45
 Gln Gln Tyr Asp Lys Trp Pro Asp Thr
 1 5

30

<210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Constructo sintético

<400> 46
 Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met His
 1 5 10

40

45

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 47
Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Arg Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10

Gly

<210> 48
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 48
Gly Ala Gly Val Leu Leu Trp Phe Gly Asp Leu Ser Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

20

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Constructo sintético

30

<400> 49
Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Constructo sintético

40

<400> 50
Gln Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

- 5 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Constructo sintético
- 10 <400> 51
 Gln Gln Asn Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
- 15 <210> 52
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Constructo sintético
- 20 <400> 52
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
- 25 <210> 53
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Constructo sintético
- 30 <400> 53
 Trp Leu Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Pro Val Trp Val Ser
 1 5 10
- 35 <210> 54
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Constructo sintético
- <400> 54

ES 2 609 088 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 55

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys
20

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 56

Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Gly Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 57

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 58

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

5

<400> 58

Gln Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 59

<211> 14

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15

<400> 59

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 60

20

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Constructo sintético

<400> 60

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Pro Asn Asn Thr Leu His Leu Glu
 1 5 10 15
 Met Lys Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

30

<210> 61

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 61

40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Asn Leu Ser Ala Ser Val Gly

ES 2 609 088 T3

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

5

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 62

Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Arg Ile Tyr
1 5 10 15

15

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 63

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ile Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

25

<210> 64
<211> 82
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 64

Cys Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro
1 5 10 15

Trp Gln His Val Asn Ala Ile Gln Gln Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu
20 25 30

Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Gln Thr Val Gln Val Ile Ser
35 40 45

Gln Met Phe Asp Leu Gln Gln Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Gln
50 55 60

35

ES 2 609 088 T3

Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro
65 70 75 80

Leu Thr

- 5 <210> 65
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Constructo sintético

- <400> 65
- Cys Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro
1 5 10

- 15 <210> 66
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Constructo sintético

- <400> 66
- Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp
1 5 10

- 25 <210> 67
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Constructo sintético

- <400> 67
- Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala
1 5 10

- 35 <210> 68
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 40 <220>
- <223> Constructo sintético

- <400> 68

Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg

1 5 10

5 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 69
 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu
 1 5 10

15 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 70
 Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu
 1 5 10

25 <210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Constructo sintético

35 <400> 71
 Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile
 1 5 10

40 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 72
 Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
 1 5 10

5
 <210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 73
 Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr
 1 5 10

15
 <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 74
 Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg
 1 5 10

25
 <210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 75
 Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
 1 5 10

35
 <210> 76
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Constructo sintético

45
 <400> 76

ES 2 609 088 T3

Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His
 1 5 10 15
 Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe
 20 25 30
 Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe
 35 40 45
 Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 50 55

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 77

Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser His
 1 5 10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 78

Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys
 1 5 10

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 79

Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu
 1 5 10

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

5 <400> 80
 His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr
 1 5 10

<210> 81
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

15 <400> 81
 Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe
 1 5 10

<210> 82
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Constructo sintético

<400> 82
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu
 1 5 10

30 <210> 83
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 83
 Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe
 1 5 10

40 <210> 84
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 84

5 Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu
1 5 10

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

15 <400> 85

Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

25 <400> 86

Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Cys Gly
1 5 10

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humano que se expresa recombinantemente y que se une de manera específica al factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una CDR1 que tiene una SEC N.º ID: 40, una CDR2 con una SEC N.º ID: 41, una CDR3 con una SEC N.º ID: 42, así como una cadena ligera que comprende una CDR1 con una SEC N.º ID: 43, una CDR2 con una SEC N.º ID: 44 y una CDR3 con una SEC N.º ID: 45, y la afinidad de unión de dicho anticuerpo anti-GM-CSF humano tiene una constante de disociación (KD) inferior a 1×10^{-10} M.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, y dicho anticuerpo comprende dos cadenas pesadas y/o dos cadenas ligeras.
- 15 3. Una composición que comprende un anticuerpo como el descrito en cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 20 4. El anticuerpo, tal y como se describe en las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria mediada por el GM-CSF.
- 25 5. El anticuerpo, tal y como se describe en las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 30 6. El anticuerpo, tal y como se describe en las reivindicaciones 1 o 2, para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa.
- 35 7. El anticuerpo para su uso, tal y como se describe en las reivindicaciones 4 a 6 (inclusive), en el que el sujeto es un ser humano.
- 40 8. El anticuerpo para su uso, tal y como se describe en la reivindicación 4, en el que la enfermedad inflamatoria mediada por el GM-CSF se selecciona de entre artritis reumatoide, esclerosis múltiple y asma.
9. El anticuerpo para su uso, tal y como se describe en la reivindicación 5, en el que el cáncer se selecciona de entre cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer pancreático, leucemia, y leucemia mielomonocítica juvenil.
10. El anticuerpo para su uso, tal y como se describe en la reivindicación 6, en el que la enfermedad infecciosa es choque septicémico.
11. El anticuerpo para su uso, tal y como se describe en la reivindicación 5, en el que dicho uso comprende, además, la administración con una sustancia quimioterápica.
12. El anticuerpo para su uso, tal y como se describe en la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo se conjuga con dicha sustancia quimioterápica.

Figura 1

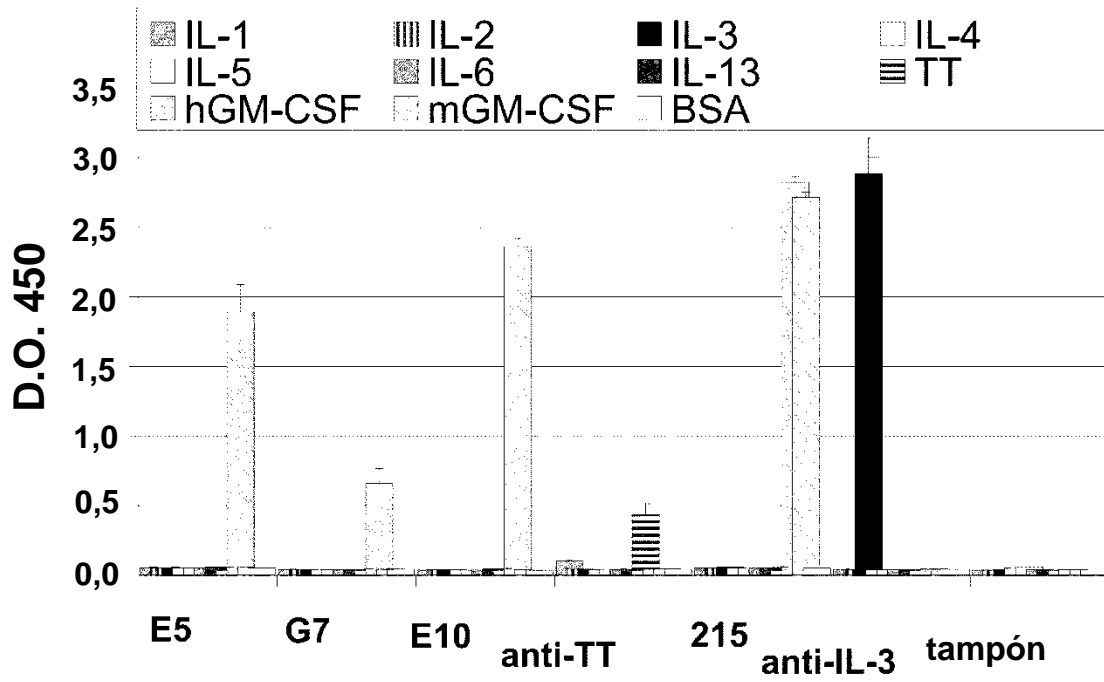


Figura 2

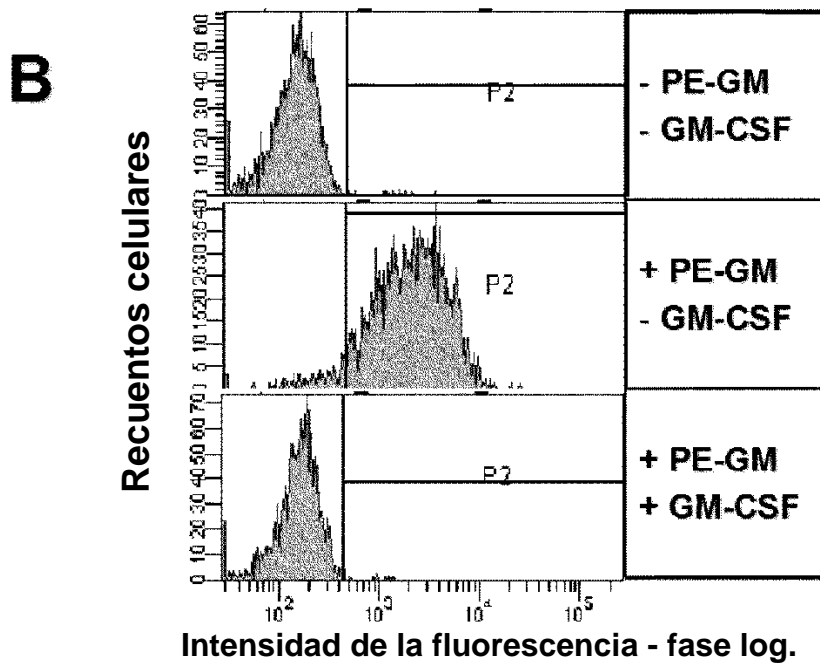
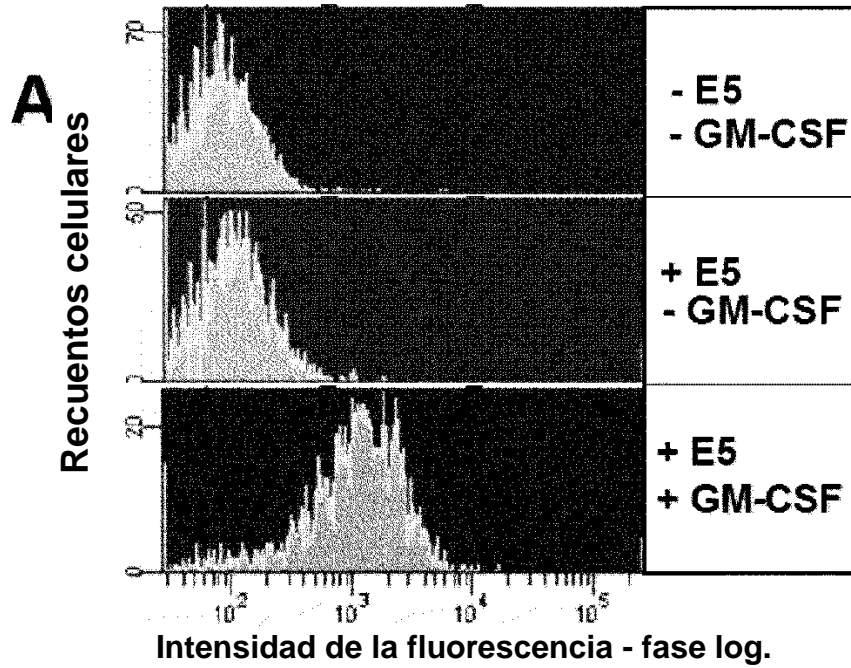


Figura 3

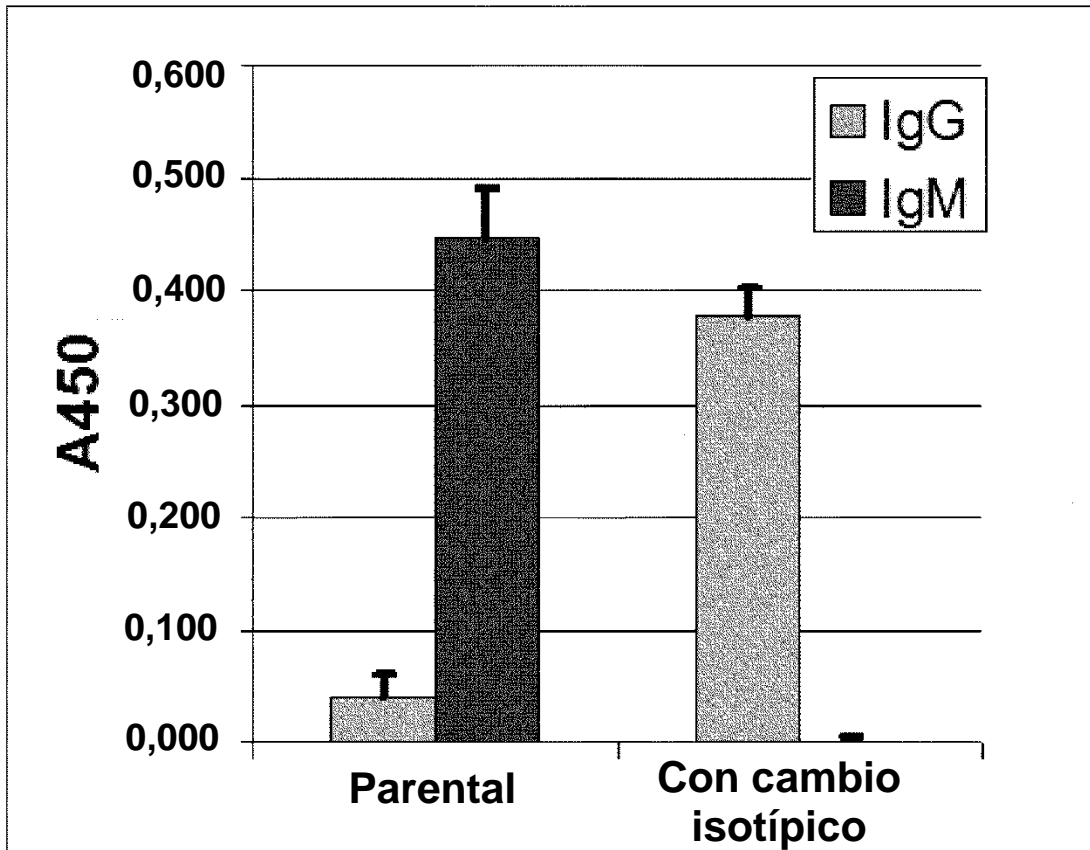


Figura 4

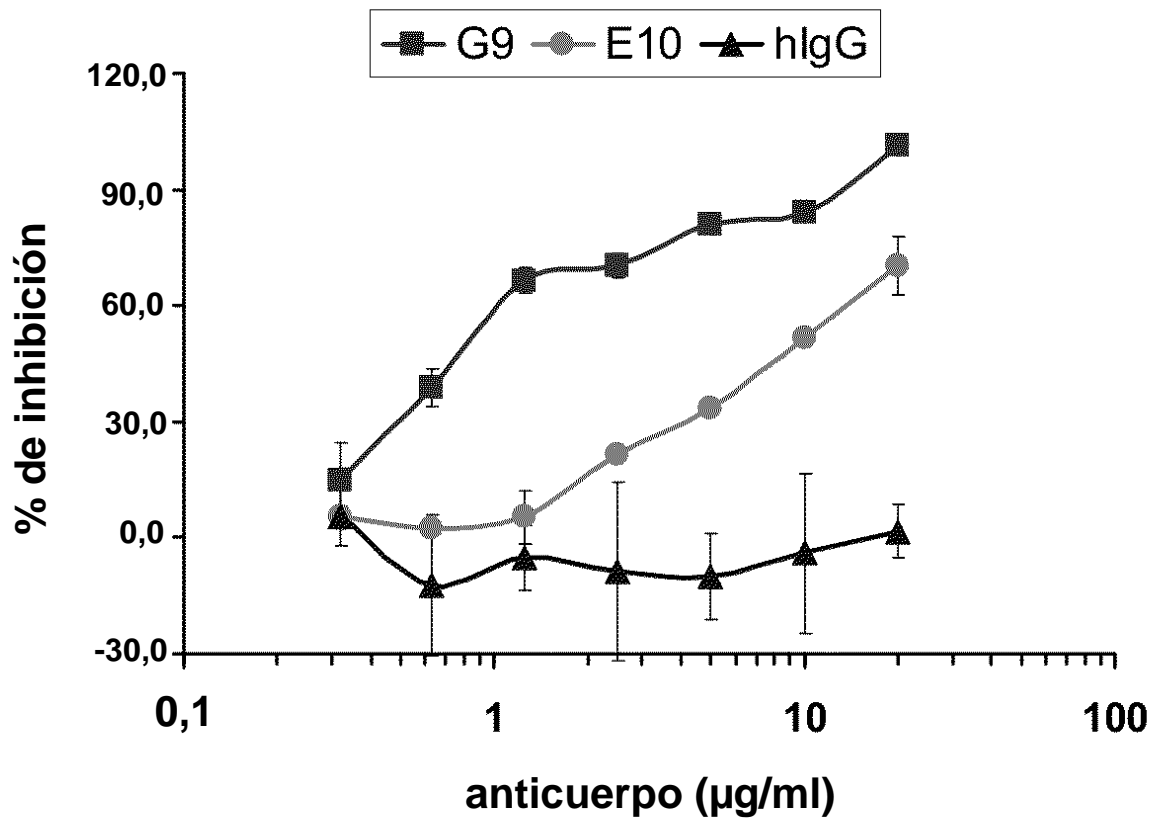


Figura 5a

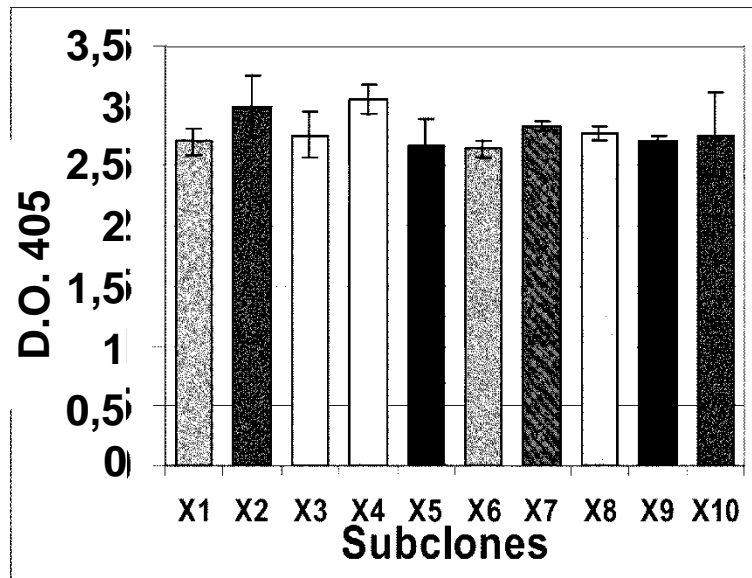


Figura 5b

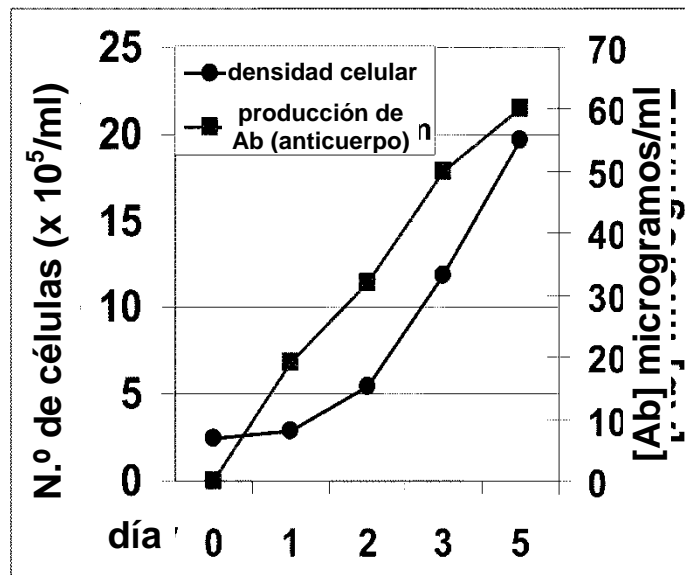


Figura 6

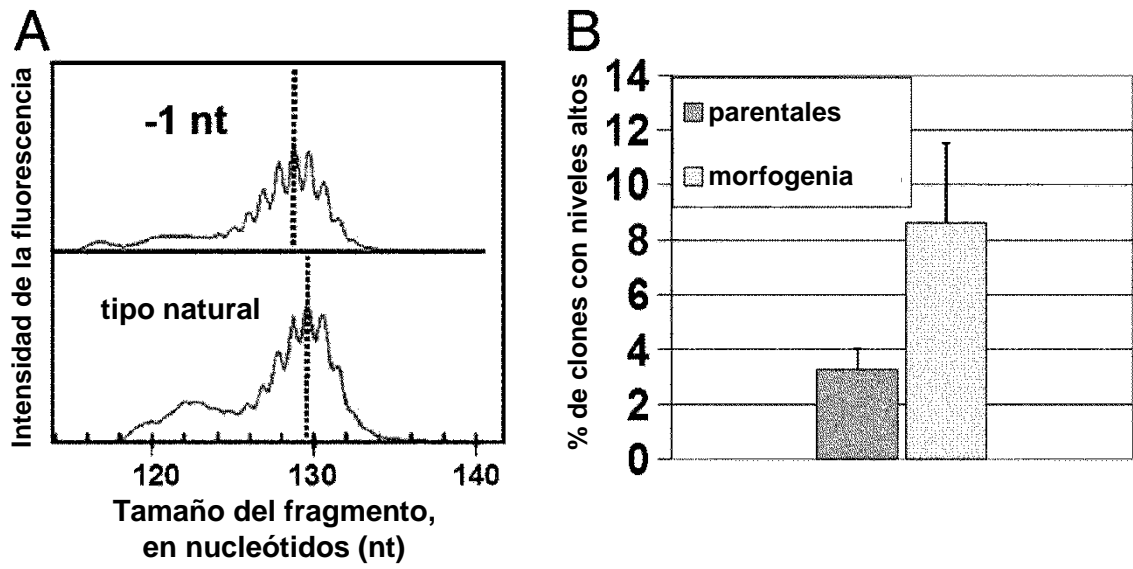
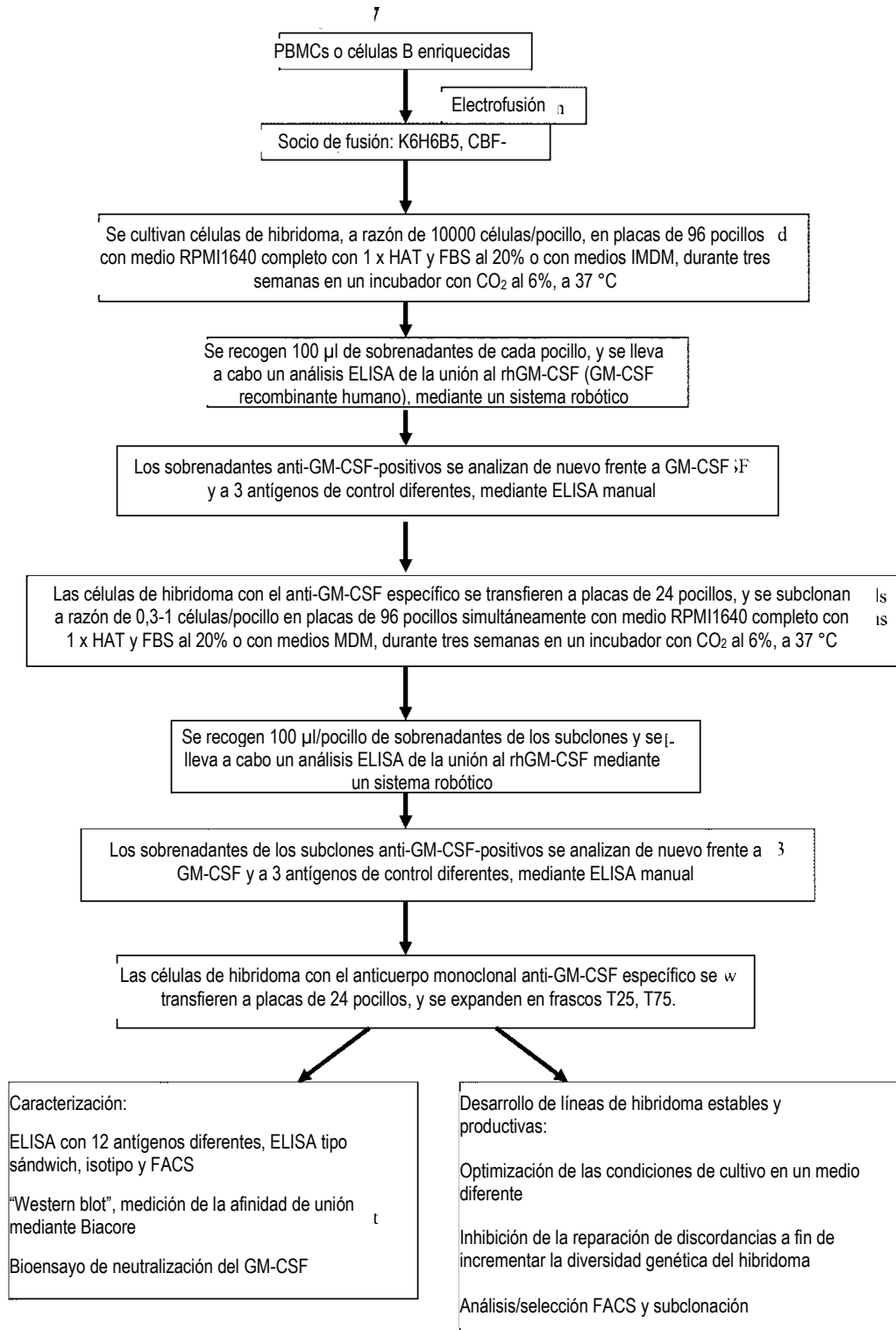


Figura 7



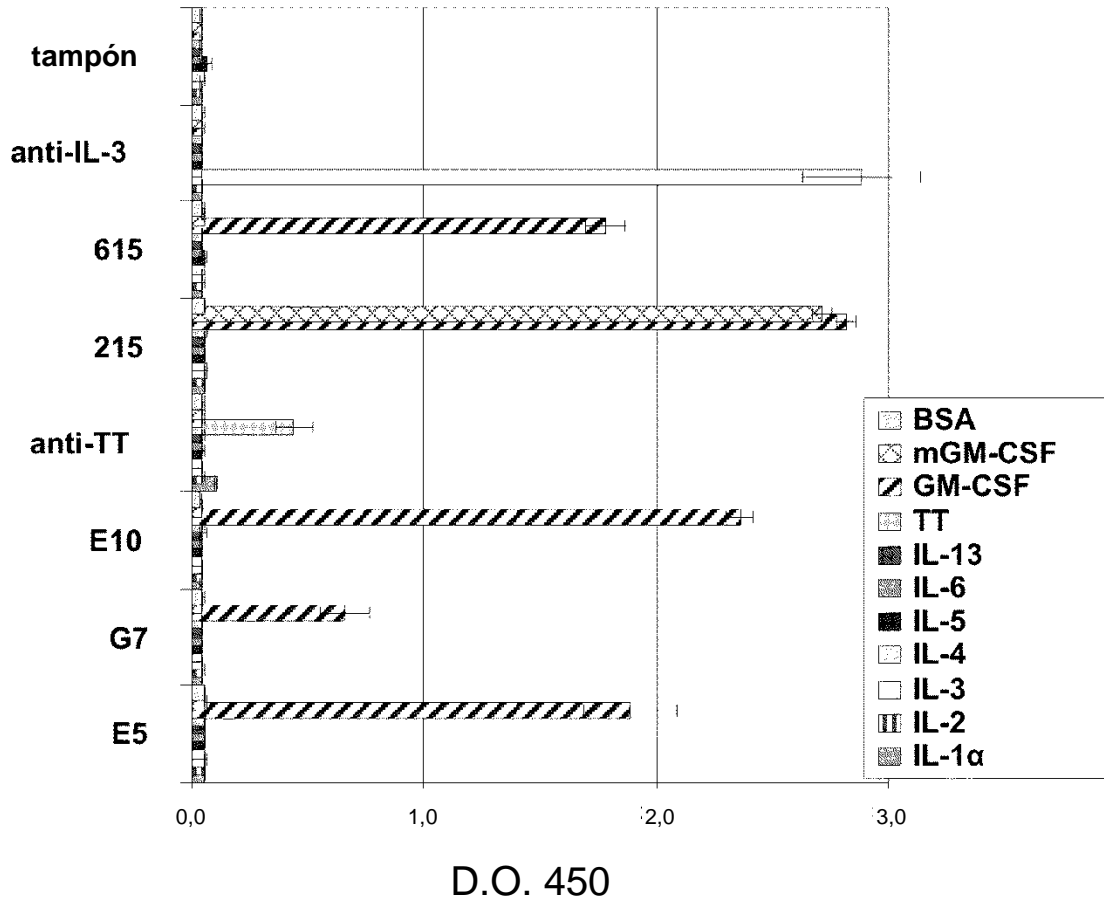


Figura 8

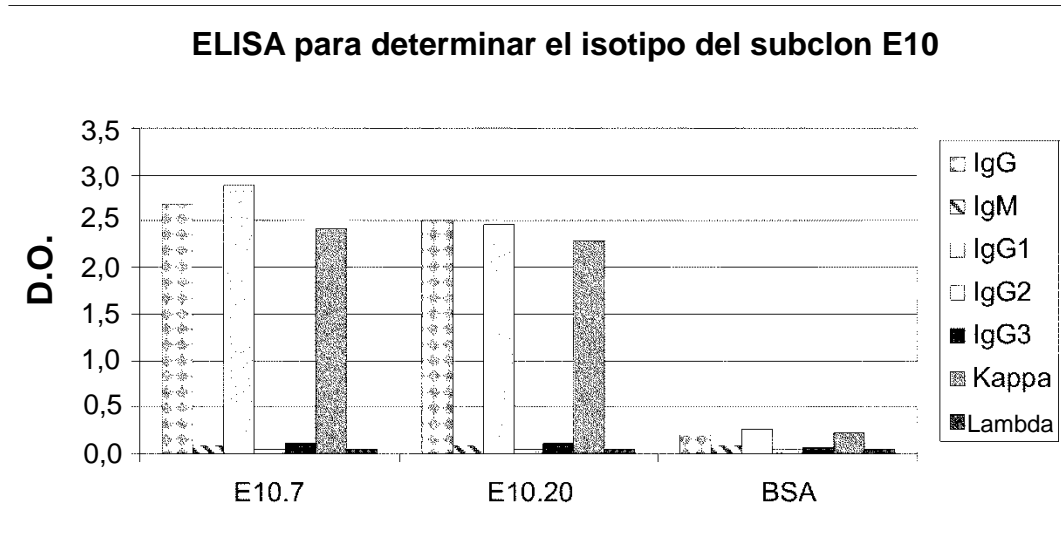


Figura 9

Figura 10

Fig 10.: Análisis “Western blot” con E10 y G9

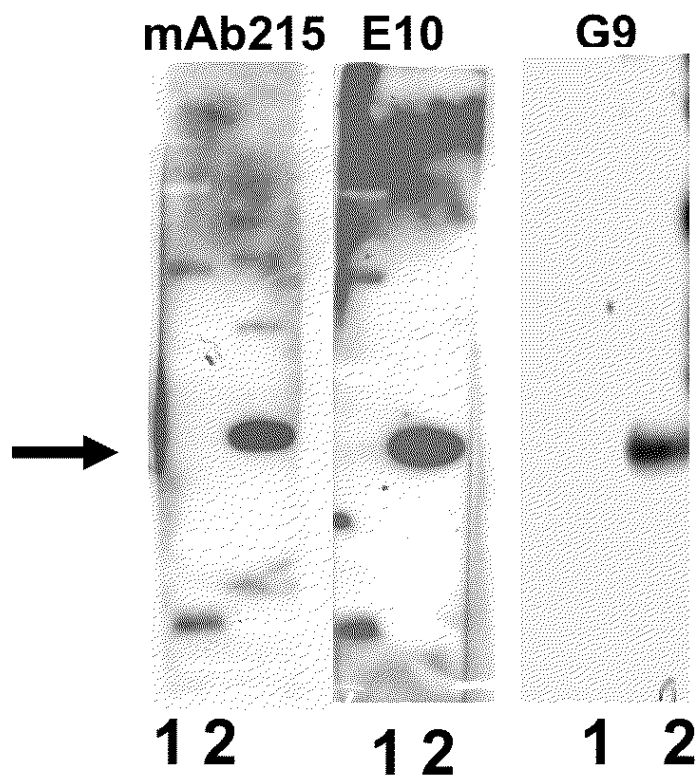


Figura 11

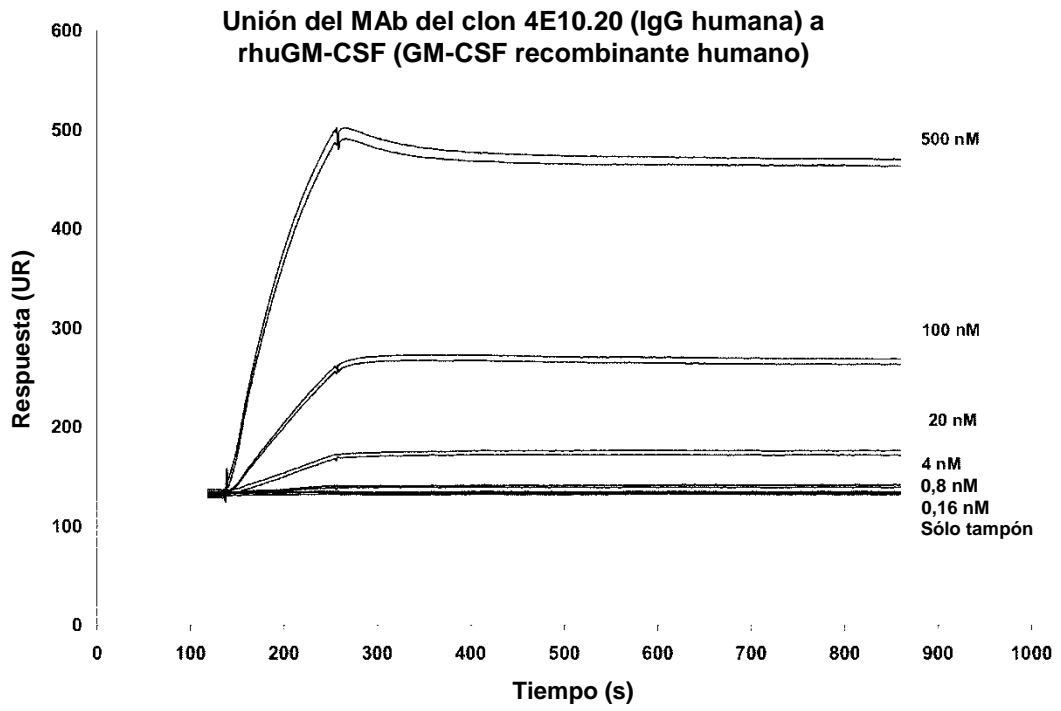


Figura 12

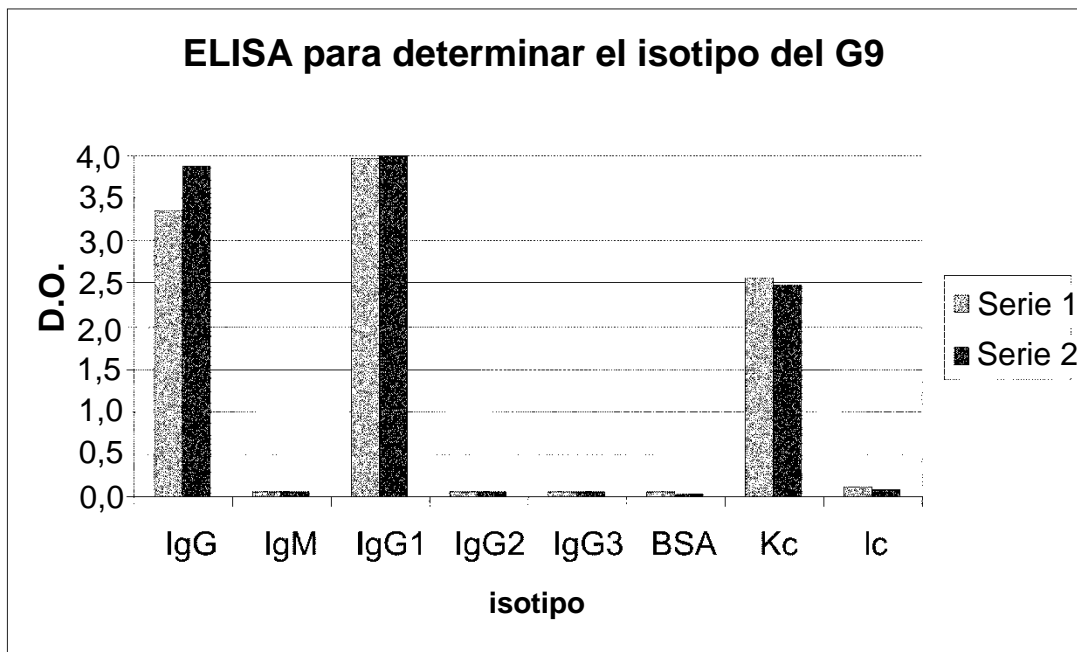


Figura 13

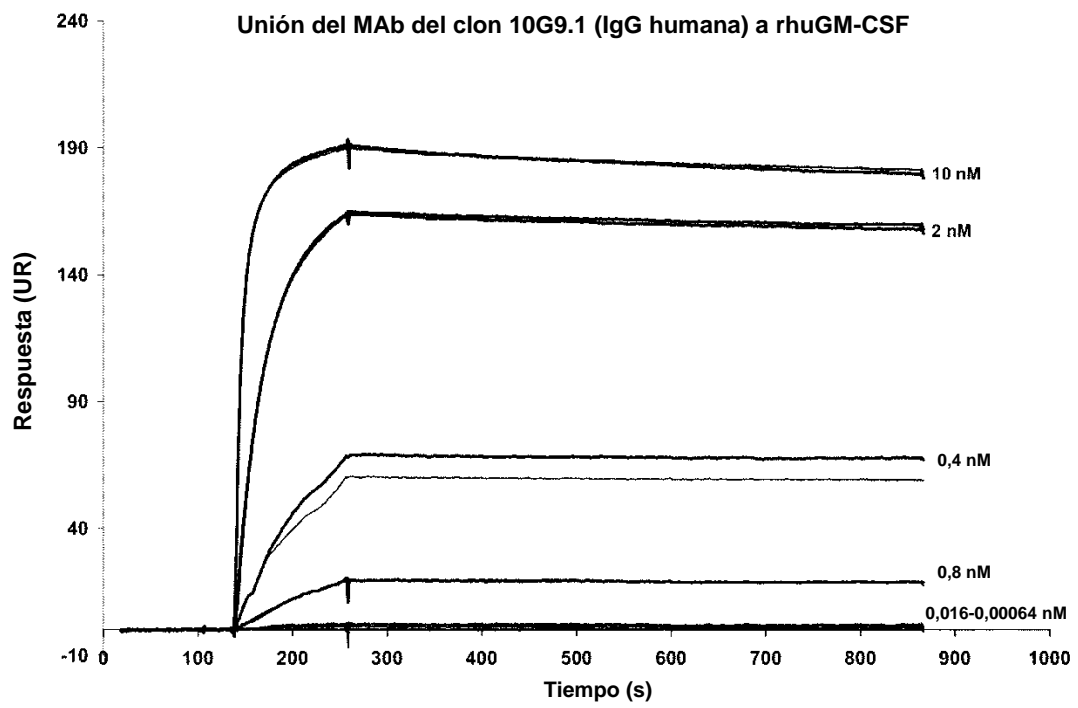


Figura 14

Mapeado del epítipo del G9

CSISAPARSFSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGSLSLTKLKGPLT
CSISAPARSFSP (12)
PARSFSPSTQPW (12)
SPSTQPWEHVNA (12)
PWEHVNAIQEAR (12)
NAIQEARLLNL (12)
ARRLLNLSRDTA (12)
NLSRDTAAEMNE (12)
TAAEMNETVEVI (12)
NETVEVISEMFD (12)
VISEMFDLQEPT (12)
FDLQEPTCLQTR (12)
PTCLQTRLELYK (12)
TRLELYKQGLRG (12)
YKQGLRGSLSLTKL (12)
RGSLSLTKLKGPLT (12)

ELKGLTMMASHYKQHCPTPETSCATQIITFESPKENLKDPELLVIPFDCWEPVQE
ELKGLTMMASH (12)
LTMASHYKQHC (12)
SHYKQHCPTPE (12)
HCPPTPETSCAT (12)
PETSCATQIITF (12)
ATQIITFESPK (12)
TFESPKENLKDF (12)
KENLKPELLVIP (12)
PELLVIPFDCWE (12)
IPFDCWEPVQE (12)

Mapeado del epítipo del G9

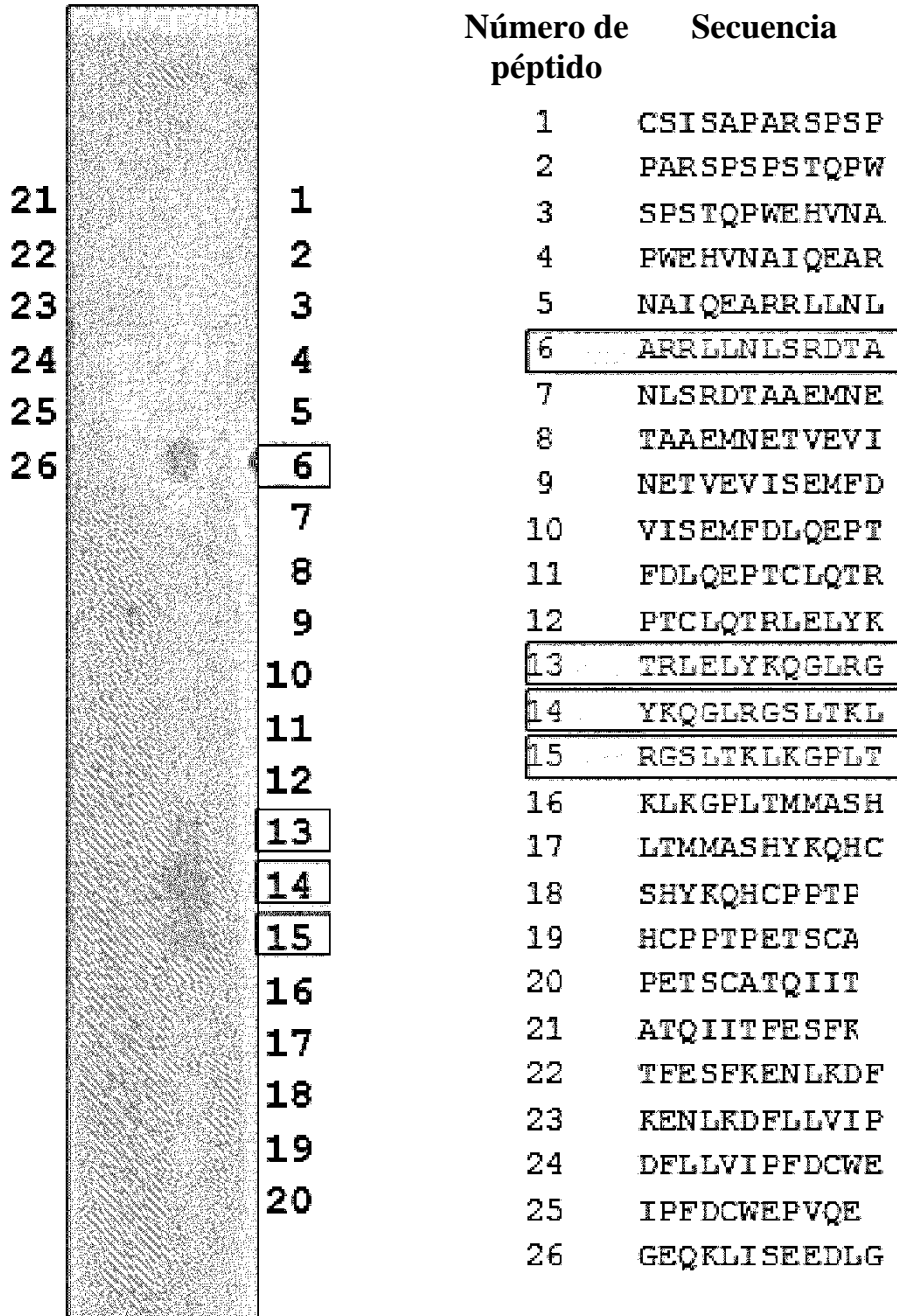


Figura 15

**INDICACIONES EN RELACIÓN A MICROORGANISMO(S) DEPOSITADO(S)
U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO**

(PCT Regla 13bis)

A. Las indicaciones hechas abajo se refieren a microorganismo(s) depositado(s) u otro material biológico referido en la descripción en la página 32 línea, 19	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO Todo depósito adicional se identifica en una hoja adicional <input checked="" type="checkbox"/>	
Nombre de la institución depositaria ATCC	
Dirección de la institución depositaria <i>(incluido el código postal y el país)</i> 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 Estados Unidos	
Fecha de depósito 18 de enero de 2007	Número de acceso PTA-8173
C. INDICACIONES ADICIONALES <i>(déjese en blanco si no procede)</i> Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HAN HECHO INDICACIONES <i>(si las indicaciones no son para todos los Estados designados)</i>	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES <i>(déjese en blanco si no procede)</i>	
Las indicaciones enumeradas a continuación se presentarán más tarde ante la Oficina Internacional <i>(especifíquese la naturaleza general de las indicaciones; por ejemplo, "Número de acceso del depósito")</i>	
Para uso de la Oficina receptora únicamente <input type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida con la solicitud internacional	Para uso de la Oficina internacional únicamente <input type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida por la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

**INDICACIONES EN RELACIÓN A MICROORGANISMO(S) DEPOSITADO(S)
U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO**

(PCT Regla 13bis)

A. Las indicaciones hechas abajo se refieren a microorganismo(s) depositado(s) u otro material biológico referido en la descripción en la página 32 línea, 19	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO Todo depósito adicional se identifica en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución depositaria ATCC	
Dirección de la institución depositaria (<i>incluido el código postal y el país</i>) 10801 University Blvd. Manassas, Virginia 20110-2209 Estados Unidos	
Fecha de depósito 2 de febrero de 2007	Número de acceso PTA-8193
C. INDICACIONES ADICIONALES (<i>déjese en blanco si no procede</i>) Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HAN HECHO INDICACIONES (<i>si las indicaciones no son para todos los Estados designados</i>)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (<i>déjese en blanco si no procede</i>)	
Las indicaciones enumeradas a continuación se presentarán más tarde ante la Oficina Internacional (<i>especifíquese la naturaleza general de las indicaciones; por ejemplo, "Número de acceso del depósito"</i>)	
Para uso de la Oficina receptora únicamente <input type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida con la solicitud internacional	Para uso de la Oficina internacional únicamente <input type="checkbox"/> Esta hoja ha sido recibida por la Oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado