

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 802**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2010 PCT/AU2010/001191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011 WO11032204**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2010 E 10816462 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2477656**

54 Título: **Tratamiento de afecciones neurológicas**

30 Prioridad:

**15.09.2009 US 242503 P**

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

**12.07.2017**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 Poplar Road  
Parkville, Victoria 3052, AU**

72 Inventor/es:

**MCKENZIE, BRENT STEVEN;  
CURWEN, PETER FREDERICK y  
MARASKOVSKY, EUGENE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 623 802 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de afecciones neurológicas

5 Campo

La presente invención se refiere en líneas generales a agentes para su uso en el tratamiento o la prevención de afecciones neurodegenerativas inflamatorias del sistema nervioso central (SNC) y, en particular, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Devic o una infección vírica y síntomas y complicaciones que surgen de la misma.

10

Antecedentes

Los detalles bibliográficos de las referencias proporcionadas en la presente memoria descriptiva se enumeran al final de la memoria descriptiva.

15

Las referencias a cualquier técnica anterior no son, y no deben adoptarse como, un conocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en ningún país.

20

La esclerosis múltiple (EM) y la enfermedad de Devic (también conocida como neuromielitis óptica [NMO]) son trastornos neurodegenerativos inflamatorios que afectan al sistema nervioso central (SNC). Están causadas por ataque autoinmunitario en que las células inflamatorias invaden el sistema nervioso conduciendo a desmielinización y a destrucción del tejido (Morales et al., *Adv Neurol* 98:27-45, 2006). Esta destrucción y desmielinización conduce a alteración de la función cognitiva y a mayor mortalidad (Bergamaschi et al., *Neuroepidemiology* 25(1):15-8, 2005; Ragonese et al., *Eur J Neurol* 15(2):123-7, 2008). La EM es más común en mujeres que en hombres, afectando a aproximadamente 3 personas por cada 100.000 (Alonso et al., *Neurology* 71(2):129-35, 2008) y puede clasificarse en las formas remitente recidivante (la mayoría de los casos) o de progresión rápida (minoría [10 %]). Actualmente, no existe cura para ninguna forma de la enfermedad. Las terapias convencionales para la inflamación neurológica incluyen tratamiento con interferón recombinante y agentes inmunosupresores tales como metilprednisolona o metotrexato (Lopez-Diego et al., *Nat Rev Drug Discov* 7(11):909-25, 2008). Estos tratamientos reducen, pero no previenen, la progresión de la enfermedad. Existe la necesidad de desarrollar un tratamiento eficaz.

25

30

Las lesiones por EM se caracterizan por infiltración de una gama de células inmunitarias incluyendo células T, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Morales *et al.*, 2006 *supra*). También se encuentran lesiones similares en pacientes con enfermedad de Devic que a menudo son más agresivas y de progresión rápida con implicación preferente de la médula espinal y de los nervios ópticos (Wingerchuk et al., *Lancet Neurol* 6(9):805-15, 2007; Wingerchuk et al., *Curr Treat Options Neurol* 10(1):55-66, 2008). Aunque se cree ampliamente que ambos trastornos son el resultado de respuestas aberrantes de células T auxiliares CD4+, las terapias dirigidas a células T han sido relativamente insatisfactorias en clínica (Lopez-Diego *et al.*, 2008 *supra*). Esto ha conducido a un enfoque renovado sobre la función de las células inmunitarias innatas en las patologías neurológicas (Weiner et al., *J Neurol* 255(Supl. 1): 3-11, 2008).

35

40

Los neutrófilos son una de las células efectoras inmunitarias innatas centrales y se reclutan rápidamente a los sitios de inflamación donde liberan agentes dañinos tales como metabolitos de oxígeno reactivo. Pueden encontrarse junto con otras células inmunitarias que se filtran en el sistema nervioso en pacientes tanto con EM como con enfermedad de Devic. El tejido de lesión y el fluido cefalorraquídeo de los pacientes con enfermedad de Devic (que a menudo se diagnostican con un mal pronóstico) son particularmente ricos en neutrófilos (Wingerchuk *et al.*, 2007; 2008; *supra*). Sin embargo, la función de los neutrófilos en las patologías del SNC sigue sin estar clara. En la bibliografía se ha sugerido que los neutrófilos tienen una función protectora o una función patogénica en modelos animales de inflamación autoinmunitaria del SNC. La reducción de neutrófilos con un anticuerpo monoclonal específico para neutrófilos en un modelo de ratón de EM reducía la gravedad de la enfermedad (McColl et al., *J Immunol* 161(11):6421-6, 1998). Por otro lado, otros investigadores que investigan los neutrófilos en un modelo de ratón de EM descubrieron que neutrófilos aislados del SNC son supresores de células T eficaces (Zehntner et al., *J Immunol* 174(8):5124-31, 2005).

45

50

55

Una citoquina implicada en las reacciones inflamatorias es el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) que está codificado por el gen *CSF-3*. G-CSF es un factor de crecimiento hemopoyético que regula la producción de granulocitos (Nicola et al., *Nature* 314:625, 1985; Metcalf, *International Journal of Cancer* 25:225, 1980; Nicola et al., *Journal of Biological Chemistry* 258:9017, 1983). G-CSF media sus efectos a través de la interacción con el receptor de G-CSF (G-CSFR, codificado por el gen *CSFR-3*), un miembro de la superfamilia de receptores de citoquinas de tipo I (Demetri et al., *Blood* 78:2791-2808, 1991). Las acciones biológicas principales de G-CSF en seres humanos y en ratones incluyen aumentar la producción y la liberación de neutrófilos desde la médula ósea (Souza et al., *Science* 232:61, 1986; Lord et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9499-9503, 1989), movilizar las células progenitoras hemopoyéticas desde la médula a la sangre periférica (Bungart et al., *British Journal of Haematology* 22:1156, 1990; de Haan et al., *Blood* 86:2986-2992, 1995; Roberts et al., *Blood* 89:2736-2744, 1997) y modular la diferenciación y las funciones efectoras de los neutrófilos maduros (Yong et al., *European Journal of Haematology* 49:251-259, 1992; Colotta et al., *Blood* 80:2012-2020, 1992; Rex et al., *Transfusion* 35:605-611, 1995; Gericke et al., *Journal of*

60

65

Leukocyte Biology 57:455-461, 1995; Xu et al., British Journal of Haematology 93:558-568, 1996; Yong, British Journal of Haematology 94:40-47, 1996; Jacob et al., Blood 92:353-361, 1998). G-CSF también actúa sobre los neutrófilos post-mitóticos maduros después de abandonar la médula ósea, incluyendo los que tienen efecto sobre la fagocitosis (Bialek et al., Infection 26(6):375-8, 1998), la apoptosis (Dibbert et al., Proc Natl Acad Sci U S A 96(23):13330-5, 1999) y el autodireccionamiento (Daglia et al., Nat Med 12(10):1185-90, 2006; Eyles et al., Blood 112(13):5193-201, 2008). G-CSF se usa para tratar la neutropenia, así como para inducir la movilización de células madre hemopoyéticas (HSC) para el trasplante de células madre autólogas y alogénicas (Welte et al., Blood 88:1907-1929, 1996).

Como se resume anteriormente, existen evidencias experimentales con anticuerpos reductores de neutrófilos que apoyan una función pro-inflamatoria del G-CSF/neutrófilos en EM. Además, los estudios de casos clínicos han informado de que algunos pacientes tratados con G-CSF presentan un empeoramiento de los síntomas clínicos (Openshaw et al., " Neurology 54(11):2147-50, 2000; Snir et al., J Neuroimmunol 172(1-2):145-55, 2006). Sin embargo, estos informes son relativamente infrecuentes y existen evidencias significativas que apoyan una función antiinflamatoria para G-CSF en afecciones de enfermedades del SNC. En el modelo animal de encefalomiélitis autoinmunitaria experimental (EAE) de EM, el tratamiento con G-CSF suministrado de forma sistémica y local (SNC) alivia la enfermedad (Zavala et al., J Immunol 168(4):2011-9, 2002). Esto es coherente con la tolerización de células T (Rutella et al., Transplantation 84(1 Supl.):S26-30, 2007) y la función neuroprotectora (Frank et al., BMC Neurosci 10:49, 2009) adjudicada a G-CSF por otros. Además, las propiedades antiinflamatorias de G-CSF se han documentado bien en otras enfermedades autoinmunitarias tales como diabetes de tipo I (Hadaya et al., J Autoimmun 24(2):125-34, 2005) y en enfermedad inflamatoria del intestino (Kudo et al., Scand J Gastroenterol 43(6):689-97, 2008). De hecho, G-CSF humano recombinante incluso se ha usado en clínica para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino (Barahona-Garrido et al., Biologics 2(3):501-4, 2008). Por tanto, G-CSF es una citoquina pleiotrópica que tiene múltiples funciones.

Existe la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para afecciones neurodegenerativas inflamatorias en el SNC tales como EM, enfermedad de Devic e infecciones víricas del cerebro.

#### Sumario

En toda esta memoria descriptiva, salvo que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se mencionan por un número identificador de secuencia (SEQ ID NO:). Las SEQ ID NO: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO: 1), <400>2 (SEQ ID NO: 2), etc. Se proporciona un sumario de los identificadores de secuencia en la Tabla 1. Se proporciona una lista de secuencias después de las reivindicaciones.

La presente invención se refiere en líneas generales al uso de antagonistas de G-CSF o su receptor en el tratamiento de afecciones neurodegenerativas inflamatorias, incluyendo afecciones patológicas del SNC. En líneas generales, las afecciones neurodegenerativas inflamatorias están asociadas con infiltración de neutrófilos. En particular, la presente invención contempla el tratamiento de esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Devic (también conocida como neuromielitis óptica o NMO) e infección vírica antagonizando G-CSF o su receptor.

La inhibición de G-CSF o de G-CSFR de forma sistémica o local y/o la regulación negativa de la expresión de un G-CSF o un G-CSFR en el tratamiento de afecciones neurodegenerativas inflamatorias se describe en este documento. Como se indica anteriormente, las afecciones neurodegenerativas generalmente son aquellas asociadas con infiltración de neutrófilos tales como EM, enfermedad de Devic y una infección vírica.

Referencias a "G-CSF" o a su nombre completo "factor estimulador de colonias de granulocitos" incluye homólogos y derivados de G-CSF. Un "homólogo" o un "derivado" incluye variantes polimórficas de G-CSF.

El término "G-CSFR" o su nombre completo "receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos" incluye homólogos y derivados de G-CSFR. Un "homólogo" o un "derivado" incluye variantes polimórficas de G-CSF.

Por "regulación negativa de la expresión de G-CSF o de G-CSFR" incluye inhibir la expresión de material genético que codifica G-CSF o G-CSFR incluyendo inhibición de la transcripción, de la traducción y/o el procesamiento del ARNm.

La expresión "inhibición de G-CSF o de G-CSFR" o "antagonismo de G-CSF o de G-CSFR" incluye la inhibición de la actividad y la función de señalización de G-CSF o de G-CSFR.

Una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC incluye una afección patológica. En líneas generales, la afección se caracteriza por o está asociada con infiltración de neutrófilos. Los ejemplos incluyen EM, enfermedad de

Devic y una infección vírica.

Por consiguiente, en este documento se describe un método para el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad de un agente eficaz para inhibir G-CSF o G-CSFR o regular negativamente la expresión de G-CSF o de G-CSFR.

En una realización particular, la presente invención proporciona un agente que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, donde el agente se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR o un fragmento de unión a G-CSF o a G-CSFR del mismo; y (b) un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo.

En este documento se describe un método para tratar una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un agente que inhibe G-CSF o G-CSFR o regula negativamente la expresión de G-CSF o de G-CSFR, estando seleccionado el agente del grupo que consiste en:

- a. un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR;
- b. un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo;
- c. una molécula con sentido o antisentido de 20 a 30 nucleótidos dirigida a una molécula de ácido nucleico que codifica G-CSF, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:3; o una molécula con sentido o antisentido de 20 a 30 nucleótidos dirigida a una molécula de ácido nucleico que codifica un G-CSFR, comprendiendo la molécula de ácido nucleico la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:7.

En líneas generales, el agente se administra durante un tiempo y en condiciones suficientes para mejorar los síntomas de la afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC. En líneas generales, la afección está asociada con infiltración de neutrófilos tal como EM, enfermedad de Devic o una infección vírica.

La administración puede ser sistémica o local. La administración sistémica es particularmente útil. Referencias a "administración sistémica" incluyen inyección intraarticular, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea, infusión, así como administración a través de vía oral, rectal y nasal, o a través de inhalación. La administración por inyección intravenosa o subcutánea es particularmente útil.

Los agentes que antagonizan G-CSF, G-CSFR o su producción incluyen moléculas proteicas, no proteicas (por ejemplo, entidades químicas) y de ácido nucleico.

Las moléculas proteicas y no proteicas incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas, moléculas químicas pequeñas, intermedias o grandes, así como moléculas identificadas por exploración del producto natural o exploración de bibliotecas químicas. La exploración de producto natural incluye la exploración de extractos o muestras de plantas, microorganismos, terrenos de lechos de río, coral, entornos acuáticos y entornos extraterrestres para moléculas o grupos de moléculas que afectan a la actividad de G-CSF o de G-CSFR o al nivel de expresión de G-CSF o de G-CSFR. Estas moléculas también pueden afectar a la interacción de G-CSF/G-CSFR o modular de otro modo la señalización mediada por G-CSF/G-CSFR.

La presente invención contempla adicionalmente la terapia de combinación tal como antagonismo de G-CSF y/o de G-CSFR en combinación con otro agente antiinflamatorio, agente inmunosupresor u otro agente usado en el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR para su uso en el tratamiento de una afección neurodegenerativa del SNC tal como, aunque sin limitación, EM, enfermedad de Devic o una infección vírica en un sujeto, que comprende opcionalmente además un agente terapéutico seleccionado de la lista que consiste en: un antiinflamatorio tal como corticosteroides; un inmunosupresor tal como mitoxantrona, acetato de glatiramer, interferones; u otro agente usado en el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC.

Un agente antagonista particular de G-CSF o de G-CSFR es un anticuerpo que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR. En una realización, el anticuerpo se une específica o selectivamente a G-CSF o a G-CSFR. Otros agentes útiles incluyen receptores solubles de G-CSF o fragmentos de unión a G-CSF de los mismos. Los inhibidores de molécula pequeña, las partes de unión a receptor de G-CSF y las moléculas de ácido nucleico que inhiben la expresión de G-CSF o de G-CSFR son otros ejemplos de agentes descritos en este documento. El anticuerpo puede ser monoespecífico o multiespecífico incluyendo biespecífico.

Por tanto, en una realización, la presente invención contempla la administración a un sujeto de una cantidad de un anticuerpo eficaz para inhibir la actividad de G-CSF o de G-CSFR. Este aspecto de la presente invención incluye la administración de un anticuerpo eficaz para inhibir la señalización mediada por G-CSF/G-CSFR.

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

Los sujetos útiles a tratarse son mamíferos y en particular seres humanos.

El uso de composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de G-CSF o de G-CSFR también se describe en este documento. Una composición puede comprender un anticuerpo anti-G-CSF o un anticuerpo anti-G-CSFR. Como se indica anteriormente, un antagonista de G-CSF o de G-CSFR incluye un antagonista de la actividad de G-CSF o de G-CSFR.

La presente invención contempla adicionalmente el uso de un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de EM, enfermedad de Devic o una infección vírica en el cerebro de un sujeto.

Otro aspecto proporciona el uso de un agente que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, donde el agente se selecciona del grupo que consiste en:

- a. un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR o un fragmento de unión a G-CSF o a G-CSFR del mismo y;
- b. un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo.

Se proporciona un sumario de los identificadores de secuencia usados en toda la presente memoria descriptiva en la Tabla 1. Se proporciona una lista de abreviaturas en la Tabla 2.

Tabla 1

<i>Sumario de identificadores de secuencia</i>	
N.º ID de secuencia	Descripción
1	Secuencia de aminoácidos de G-CSF humano que incluye la secuencia líder
2	Secuencia de nucleótidos codificante y no codificante de G-CSF humano
3	Secuencia de nucleótidos de G-CSF humano que codifica la proteína madura
4	Secuencia de aminoácidos de la proteína madura G-CSF humano
5	Secuencia de aminoácidos de G-CSF3R humano que incluye la secuencia líder
6	Secuencia de nucleótidos codificante y no codificante de G-CSF3R humano
7	Secuencia de nucleótidos de G-CSF3R humano que codifica la proteína madura
8	Secuencia de aminoácidos de la proteína madura G-CSF3R humano

Tabla 2

<i>Abreviaturas</i>	
Abreviatura	Descripción
SNC	Sistema nervioso central
EAE	Encefalomiелitis inmunitaria experimental
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
G-CSFR	Receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos
EM	Esclerosis múltiple
NMO	Neuromielitis óptica (también conocida como enfermedad de Devic)

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación gráfica que muestra que ratones deficientes en G-CSF están protegidos de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en comparación con ratones de tipo silvestre (C57B1/6). La enfermedad se controló del día 0 al 30 y se determinaron los valores de parálisis indicados en la sección experimental.

La Figura 2 es una representación gráfica que muestra que el bloqueo de la acción de G-CSF con un anticuerpo anti-G-CSF inhibe la progresión de la enfermedad en el modelo de EAE en ratones de tipo silvestre (C57B1/6) en comparación con animales tratados con control de isotipo. La enfermedad se controló del día 0 al 30 y se determinaron los valores de parálisis indicados en la sección experimental.

5 Las Figuras 3a a e son representaciones gráficas de un análisis en el curso de tiempo del porcentaje de neutrófilos en diversas muestras tomadas de animales tratados con anticuerpo de control de isotipo y anti-G-CSF.

10 La Figuras 4a a i son representaciones que muestran los niveles de diversas citoquinas después de la reactivación de células T purificadas de animales tratados con anticuerpo de control de isotipo y anti-G-CSF sacrificados en el día 10.

#### Descripción detallada

15 Las formas singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen aspectos plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, referencias a "una afección neurodegenerativa" incluyen una única afección, así como dos o más afecciones; referencias a "un antígeno" incluyen un único agente, así como dos o más agentes; referencias a "la invención" incluyen un único aspecto y múltiples aspectos de una invención; y así sucesivamente.

20 La presente invención se refiere a un agente que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR para su uso en el tratamiento o profilaxis de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, donde el agente se selecciona del grupo que consiste en:

- 25 a) un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR o un fragmento de unión a G-CSF o a G-CSFR del mismo; y
- b) un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo.

30 Expresado de forma alternativa, la invención proporciona el uso de un agente que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, donde el agente se selecciona del grupo que consiste en:

- 35 a) un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR o un fragmento de unión a G-CSF o a G-CSFR del mismo; y
- b) un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo.

40 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente para su uso en el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, donde el agente se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR o un fragmento de unión a G-CSF o a G-CSFR del mismo; y
- b) un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo.

45 Los términos "agente", "compuesto" y "activo" pueden usarse de forma intercambiable en este documento para hacer referencia a una sustancia que induce un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado de antagonismo de G-CSF, G-CSFR, interacción de G-CSF/G-CSFR, señalización mediada por G-CSF/G-CSFR y/o expresión de G-CSF o de G-CSFR. Los términos también abarcan formas farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activas de los mismos, incluyendo sales. El efecto deseado es la inhibición de la actividad de G-CSF o de G-CSFR.

50 Los agentes contemplados en este documento que inhiben la actividad de G-CSF o de G-CSFR incluyen:

- a. un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR; y
- b. un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo.

55 La terapia de combinación que implica el uso de un antagonista de G-CSF o de G-CSFR que es un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR o un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo junto con otro agente terapéutico tal como un agente antiinflamatorio, inmunosupresor y/u otro agente usado en el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC también se contempla por la presente invención.

60 Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales y todas las diversas formas derivadas de anticuerpos monoclonales, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos de longitud completa (por ejemplo, que tienen una región Fc intacta), fragmentos de unión a antígeno, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>; y polipéptidos derivados de anticuerpo producidos usando métodos recombinantes tales como anticuerpos de cadena sencilla. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" como se usan en este documento también se refieren a anticuerpos humanos producidos, por ejemplo, en animales transgénicos o

a través de presentación en fagos, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados o anticuerpos desinmunizados. También incluye otras formas de anticuerpos que pueden ser fragmentos terapéuticamente aceptables y de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, anticuerpos de un dominio derivados de animales marinos cartilaginosos o *Camelidae*, o de bibliotecas basadas en dichos anticuerpos. La selección de fragmentos o formas modificadas de los anticuerpos también puede implicar cualquier efecto que los fragmentos o formas modificadas tengan sobre sus semividas. Por ejemplo, puede ser ventajoso, en ciertas circunstancias, que un anticuerpo tenga una corta semivida para evitar los efectos globales del tratamiento anti-G-CSF/G-CSFR, tal como neutropenia. Como alternativa, cuando son comunes o probables las exacerbaciones, puede ser ventajoso un anticuerpo con una semivida más larga. Una "semivida" para un anticuerpo se considera en este documento que es corta si es en 2 días o menos. Una semivida más larga para un anticuerpo sería cualquier semivida en exceso de 2 días y más particularmente puede ser de más de 7 días.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se usa en este documento para hacer referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. El modificador "monoclonal", como se usa en este documento, por lo tanto, indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se usa para indicar que el anticuerpo se produjera por un método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991 o Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991.

Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usan en este documento significan una cantidad suficiente de un agente que proporciona el efecto o resultado terapéutico o fisiológico deseado, inhibiendo la actividad de G-CSF o de G-CSFR. Además, el efecto puede ser una mejora de los síntomas de la afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC tal como EM, enfermedad de Devic o una infección vírica en el cerebro. Los efectos indeseables, por ejemplo, efectos secundarios, a veces pueden manifestarse junto con el efecto terapéutico deseado; por tanto, un facultativo equilibra los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales al determinar lo que es una "cantidad eficaz" apropiada. La cantidad exacta de agente requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por tanto, puede no ser posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la materia usando experimentación rutinaria. Por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo anti-G-CSF/G-CSFR de mejorar los efectos de EM, enfermedad de Devic o una infección vírica en el cerebro puede evaluarse en un sistema de modelo animal. Un experto en la materia sería capaz de determinar las cantidades requeridas basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o la vía de administración seleccionada.

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

Referencias a "una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC" incluyen una afección patológica del SNC tal como cualquier respuesta inflamatoria exagerada o excesiva o prolongada en el SNC. En líneas generales, la afección neurodegenerativa inflamatoria está asociada con infiltración de neutrófilos en el SNC. La afección del SNC puede ser crónica o aguda o una fase entremedias. Las formas agudas recidivantes tales como exacerbaciones de una afección crónica también se contemplan por la presente invención. La presente invención se refiere particularmente a EM, enfermedad de Devic (NMO) y a una infección vírica en el cerebro.

En líneas generales, el agente se proporciona con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o farmacológicamente aceptable.

Un vehículo, diluyente y/o excipiente "farmacéuticamente aceptable" es un vehículo farmacéutico comprendido de un material que no es biológicamente indeseable o indeseable de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un sujeto junto con el agente antagonizante de G-CSF/G-CSFR seleccionado sin causar ninguna reacción adversa o una reacción adversa sustancial. Los vehículos pueden incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes usados para ajustar la tonicidad, tampones, agentes quelantes y agentes retardadores de la absorción y similares.

Asimismo, una sal "farmacológicamente aceptable" de un antígeno como se proporciona en este documento es una sal, que no es biológicamente indeseable o indeseable de otro modo.

Los términos "tratar" y "tratamiento", como se usan en este documento se refieren a tratamiento terapéutico y pueden incluir medidas profilácticas o preventivas. Por ejemplo, el tratamiento puede producir una reducción en la gravedad y/o la frecuencia de los síntomas de la afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC, la eliminación de los síntomas y/o la causa subyacente de la afección, la prevención de la aparición de síntomas de la afección y/o su causa subyacente y mejora o remedio o alivio de los daños después de la afección neurodegenerativa inflamatoria. Dichos síntomas o características incluyen infiltración aumentada de neutrófilos, neutrófilos aumentados en fluido cefalorraquídeo, liberación aumentada de factores derivados de neutrófilos incluyendo, aunque sin limitación, factores antimicrobianos (tales como mieloperoxidasa y calprotectina), proteinasas (tales como elastasa), hidrolasas ácidas (tales como catepsinas), quimioquinas y citoquinas. Por tanto, el tratamiento puede no producir una "cura", sino en su lugar una mejora de los síntomas. Además, el tratamiento puede no comenzar hasta que aparezca un evento de exacerbación. En este contexto, el término "profiláctico" también se aplica a la prevención o al tratamiento de la probabilidad de que suceda un evento de exacerbación. Un ejemplo de un evento de exacerbación incluye una apoplejía u otro evento de la vasculatura sistémica y una infección por un agente patogénico tal como un virus.

Los anticuerpos también pueden ser quiméricos, que incluyen anticuerpos contra G-CSF o G-CSFR que comprenden las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos de rata o de conejo contra G-CSF o G-CSFR y los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana.

Los términos "afección" y "enfermedad" se usan de forma intercambiable en toda la presente memoria descriptiva.

Un "sujeto", como se usa en este documento se refiere a un animal, particularmente un mamífero y más particularmente un ser humano que puede beneficiarse de las composiciones farmacéuticas y agentes de la presente invención. No existe limitación sobre el tipo de animal que podría beneficiarse de las composiciones farmacéuticas y agentes descritos en la presente. Un sujeto independientemente de si es un ser humano o un animal no humano, puede mencionarse como individuo, paciente, animal, hospedador o destinatario, así como sujeto. Los compuestos y agentes de la presente invención tienen aplicaciones en medicina humana y en medicina veterinaria.

Los mamíferos particulares son seres humanos y animales de ensayo de laboratorio. Los ejemplos de animales de ensayo de laboratorio incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas, hámsteres, gatos y perros y primates.

Un agente particularmente útil de la presente invención es un anticuerpo contra G-CSF o G-CSFR que inhibe la señalización de G-CSF a través del receptor de G-CSF. Dichos anticuerpos contra G-CSF pueden mencionarse como anticuerpos anti-G-CSF, y los anticuerpos contra G-CSFR pueden mencionarse como anticuerpos anti-G-CSFR. Cuando se pretende hacer referencia a un anticuerpo anti-G-CSF o un anticuerpo anti-G-CSFR, se puede hacer referencia simplemente a un anticuerpo o anticuerpos anti-G-CSF/G-CSFR.

Aunque tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales pueden producirse fácilmente, los anticuerpos monoclonales son particularmente preferidos ya que pueden generarse en grandes cantidades, son altamente específicos y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son homogéneas, haciéndolas ideales para generar fragmentos de unión a antígeno y otros derivados de anticuerpo modificados por ingeniería para aplicaciones terapéuticas.

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

El método de hibridoma descrito anteriormente se usa en animales, tales como ratones, para producir anticuerpos monoclonales. Sin embargo, los anticuerpos derivados de animales generalmente son inadecuados para su administración a seres humanos ya que pueden causar una respuesta inmunitaria. Como se describe a continuación, dichos anticuerpos pueden modificarse para hacerlos adecuados para su administración a seres humanos o el sujeto no animal deseado.

Los anticuerpos anti-G-CSF/G-CSFR, por ejemplo, pueden producirse usando métodos recombinantes (por ejemplo, en un sistema de expresión de *E. coli*) bien conocidos en la técnica. En este enfoque, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales, tales como los anticuerpos monoclonales murinos descritos en este documento, pueden aislarse de las líneas celulares de hibridoma, secuenciarse usando procedimientos convencionales y opcionalmente manipularse usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, el ADN puede fusionarse a otro ADN de interés, o alterarse (tal como por mutagénesis u otras técnicas convencionales) para añadir, delecionar o sustituir uno o más restos de ácido nucleico. El ADN puede colocarse en vectores que después se introducen por transfección o por transformación en células hospedadoras apropiadas usando métodos bien conocidos en la técnica (tal como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461 y 4.959.455). El ADN aislado de las líneas celulares de hibridoma también puede modificarse para cambiar el carácter del anticuerpo producido por su expresión.

Por ejemplo, pueden producirse formas quiméricas de anticuerpos monoclonales murinos anti-G-CSF/G-CSFR reemplazando los nucleótidos que codifican dominios constantes seleccionados de cadena pesada y ligera murina con nucleótidos que codifican dominios constantes de cadena pesada y ligera humana, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 y por Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984. Los anticuerpos quiméricos entonces se producen en una línea celular apropiada, tal como una línea celular de mieloma murino, que se a transfectado con ADN modificado.

Por tanto, entre los anticuerpos contemplados para su uso en la presente invención están los anticuerpos quiméricos anti-G-CSF/G-CSFR que comprenden las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal murino anti-G-CSF/G-CSFR fusionado a dominios constantes de anticuerpo de cadena pesada y ligera no murino. En una realización particular, los dominios constantes de cadena pesada y ligera no murina son dominios constantes de anticuerpo de cadena pesada y ligera humano. Asimismo, los anticuerpos quiméricos pueden incluir anticuerpos contra G-CSF o G-CSFR que comprenden las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos de rata o conejo contra G-CSF o G-CSFR y dominios constantes de cadena pesada y ligera humano.

Los anticuerpos anti-G-CSF/G-CSFR para su uso en la presente invención también incluyen anticuerpos humanizados. En general, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos (el anticuerpo receptor) en que los restos de la región determinante de complementariedad (CDR) se han reemplazado por restos de la región CDR de una especie no humana (el anticuerpo donante), tal como de un ratón, rata, conejo o primate no humano. En algunos casos, ciertos restos de la región flanqueante (FR) del anticuerpo humano también pueden reemplazarse por restos no humanos correspondientes, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para potenciar el rendimiento y la afinidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos una y típicamente dos regiones variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponde a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado también puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo (Fc), típicamente la de un anticuerpo humano (Jones et al., Nature 321:522-525, 1986; Reichmann et al., Nature 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439, 1987; Larrick et al., Bio/Technology 7:934, 1989; Winter & Harris, TIPS 14:139, 1993; Carter et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 89:4285 1992). Asimismo, para crear un anticuerpo primatizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una región flanqueante de primate usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 93/02108 y el documento WO 99/55369).

Como alternativa, puede crearse un anticuerpo humanizado por un proceso de "revestimiento". Un análisis estadístico de regiones variables únicas de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y murina reveló que los patrones precisos de restos expuestos son diferentes en anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones superficiales individuales tienen una fuerte preferencia por una pequeña cantidad de restos diferentes (véase, Padlan et al., Mol.Immunol. 28:489- 498, 1991 y Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235:959-973, 1994). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando los restos expuestos en sus regiones flanqueantes que difieren de los habitualmente encontrados en anticuerpos humanos. Como la antigenicidad proteica puede correlacionarse con la accesibilidad superficial, el remplazo de los restos superficiales puede ser suficiente para hacer que la región variable murina sea "invisible" al sistema humanitario humano. Este procedimiento de humanización se menciona como "revestimiento" porque solamente la superficie del anticuerpo se altera, los restos de soporte permanecen inalterados.

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

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

En una realización particular, los anticuerpos para su uso en la presente invención son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra G-CSF o G-CSFR pueden generarse usando

ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema murino. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones mencionados en este documento como ratones HuMAb y ratones KM.

5 Adicionalmente, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para crear anticuerpos. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo mencionado como Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963.

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

15 Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse usando métodos de presentación en fagos para explorar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Dichos métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo: patentes de Estados Unidos n.º 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698; patentes de Estados Unidos n.º 5.427.908 y 5.580.717; Patentes de Estados Unidos n.º 5.969.108 y 6.172.197 y Patentes de Estados Unidos n.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 20 6.582.915 y 6.593.081.

Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse usando ratones SCID en que las células inmunitarias humanas se han reconstituido de modo que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.476.996 y 5.698.767.

Los anticuerpos anti-G-CSF/G-CSFR para su uso en la presente invención también incluyen fragmentos de unión a antígeno tales como fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>. Tradicionalmente, los fragmentos de unión a antígeno se generaron por la digestión proteolítica de anticuerpos completos (Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117, 1992; Brennan *et al.*, *Science* 229:81, 1985). Ahora se han desarrollado varios métodos recombinantes para producir fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos directamente en células 30 hospedadoras recombinantes.

Por ejemplo, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167, 1992). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> también pueden formarse usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula F(ab')<sub>2</sub>. Los fragmentos Fv, Fab o F(ab')<sub>2</sub> también pueden aislarse directamente de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Se han desarrollado varios métodos recombinantes para la producción de anticuerpos de cadena sencilla incluyendo los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778; Bird, *Science* 242:423, 1988, 40 Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988 y Ward et al., *Nature* 334:544, 1989. Los anticuerpos de cadena sencilla pueden formarse uniendo fragmentos de la región variable (región Fv) de cadena pesada (V<sub>H</sub>) y ligera (V<sub>L</sub>) a través de un corto enlazador peptídico para proporcionar una única cadena polipeptídica (scFv). Los scFv también pueden formar dímeros o trímeros, dependiendo de la longitud de un enlazador peptídico entre las dos 45 regiones variables (Korrt et al., *Protein Engineering* 10:423, 1997). La presentación en fagos es otro método recombinante bien conocido para producir los fragmentos de unión a antígeno para su uso en la presente invención.

Los fragmentos de unión a antígeno para su uso en la presente invención pueden explorarse para las propiedades deseadas. Los ensayos descritos en este documento proporcionan el medio para identificar fragmentos de unión a antígeno que se unen a G-CSF o a G-CSFR y que antagonizan la señalización de G-CSF a través de G-CSFR.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, *inter alia*, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, 55 células de riñón de cría de hámster (BHK), células renales de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, células 3T3, y otras varias líneas celulares. Las células hospedadoras de mamífero incluyen células humanas, de ratón, de rata, de perro, de cerdo, de cabra, bovinas, de caballo y de hámster. Las líneas celulares de particular preferencia se seleccionan a través de la determinación de las líneas celulares que tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9, células de anfibio, células bacterianas, células vegetales y células 60 fúngicas. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican la cadena pesada y la parte de unión a antígeno de la misma, la cadena ligera y/o la parte de unión a antígeno de la misma en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en que se cultivan las células hospedadoras.

Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas. Además, la expresión de los anticuerpos para su uso en la invención desde líneas de células hospedadoras puede potenciarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para potenciar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se analiza en su totalidad o en parte en relación con las patentes europeas n.º 0 216 846, 0 256 055, y 0 323 997 y la solicitud de patente europea n.º 89303964.4.

Los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos pueden tener diferentes patrones de glucosilación entre sí. Sin embargo, todos estos anticuerpos contra G-CSF o G-CSFR para su uso en el tratamiento de afecciones del SNC inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario son parte de la presente invención, independientemente del patrón de glucosilación de los anticuerpos.

También se conocen técnicas para obtener un anticuerpo de una subclase o isotipo diferente de un anticuerpo de interés, es decir, cambio de subclase. Por tanto, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales IgG1 o IgG4 a partir de un anticuerpo monoclonal IgM, por ejemplo, y viceversa. Dichas técnicas permiten la preparación de nuevos anticuerpos que poseen las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo dado (el anticuerpo precursor), pero también muestran propiedades biológicas asociadas con un isotipo o subclase de anticuerpo diferente del anticuerpo precursor. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante. El ADN clonado que codifica polipéptidos de anticuerpo particulares puede emplearse en dichos procedimientos, por ejemplo, el Y que codifica la región constante de un anticuerpo del isotipo de interés.

Los vectores disponibles para clonación y expresión en líneas de células hospedadoras son bien conocidos en la técnica, e incluyen, aunque sin limitación, vectores para la clonación y la expresión en líneas celulares de mamífero, vectores para clonación y la expresión en líneas celulares bacterianas, vectores para la clonación y la expresión en fagos y vectores para la clonación y la expresión en líneas celulares de insecto. Los anticuerpos pueden recuperarse usando métodos convencionales de purificación de proteínas.

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

Particularmente, los anticuerpos humanos o humanizados anti-G-CSF/G-CSFR están en forma aislada, homogénea o completa o parcialmente purificada.

Más particularmente, los anticuerpos humanos o humanizados anti-G-CSF/G-CSFR son anticuerpos monoclonales de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno.

Como se indica anteriormente, la selección de fragmentos de unión a antígeno o de formas modificadas de los anticuerpos puede verse influenciada por el efecto que los fragmentos o las formas modificadas tienen sobre la semivida individual.

Otro ejemplo de un agente útil es una forma soluble del G-CSFR que compite con el G-CSFR asociado a membrana de origen natural por la interacción con G-CSF. Los expertos en la materia pueden preparar fácilmente formas solubles del receptor, véase, por ejemplo, el documento US 5.589.456 y Honjo et al., Acta Crystallograph Sect F Struck Biol Cryst Commun. 61 (Pt 8):788-790, 2005.

Las expresiones "ácidos nucleicos", "nucleótido" y "polinucleótido" incluyen ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, hebras tanto con sentido como antisentido, y pueden modificarse química o bioquímicamente o pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo (tal como el anillo morfolina), modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos  $\alpha$ -anoméricos, etc.). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan los polinucleótidos en su capacidad de unirse a una secuencia indicada a través de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Dichas moléculas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en que los enlaces peptídicos se sustituyen por enlaces fosfato en la estructura de la molécula.

El aspecto descrito anteriormente puede lograrse por biología molecular convencional y técnicas de ADN recombinante. Las técnicas son bien conocidas en la técnica y se describen en diversas publicaciones, tales como Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II, D. N. Glover ed. 1985 y Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994.

Los ácidos nucleicos pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras naturales (control de la expresión) o pueden asociarse con secuencias heterólogas, incluyendo promotores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES)

y otras secuencias de sitio de unión al ribosoma, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificantes 5' y 3' y similares.

Un "promotor" o "secuencia promotora" es una región reguladora del ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante. Una secuencia promotora generalmente se une en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende cadena arriba en la dirección 5' para incluir la cantidad mínima de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a cualquier nivel. Un sitio de inicio de la transcripción, así como los dominios de unión a proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa pueden encontrarse dentro de la secuencia promotora. El promotor puede estar asociado de forma funcional con otras secuencias de control de la expresión, incluyendo secuencias potenciadoras y represoras o con un ácido nucleico descrito en este documento. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión génica incluyen el promotor de citomegalovirus (CMV) y la región promotora temprana de SV40.

Una secuencia codificante está "bajo el control de", "asociada funcionalmente con" o "asociada de forma funcional con" secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando las secuencias dirigen la transcripción mediada por la ARN polimerasa de la secuencia codificante en ARN, preferiblemente ARNm, que después puede sufrir corte y empalme de ARN en trans (si contiene intrones) y, opcionalmente, traducirse en una proteína codificada por la secuencia codificante.

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

Las expresiones "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo (tal como un plásmido) por el que la secuencia de ADN o de ARN puede introducirse en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y, opcionalmente, promover la expresión y/o la replicación de la secuencia introducida.

El término "transfección" o "transformación" significa la introducción de un ácido nucleico en una célula. Estos términos pueden referirse a la introducción de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de reacción cruzada con citoquinas o un fragmento del mismo en una célula. Una célula hospedadora que recibe el ADN o el ARN introducido se ha "transformado" y es un "transformante" o un "clon". El ADN o el ARN introducido en una célula hospedadora puede provenir de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula hospedadora, o células de un género o especie diferente.

La expresión "célula hospedadora" significa cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, modifica, transfecta, transforma, cultiva o usa o manipula de cualquier manera, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo, la expresión de una proteína o la replicación de un gen.

La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora o vector compatible que, en condiciones adecuadas, puede expresar una proteína o un ácido nucleico que transporta el vector e introduce en la célula hospedadora. Los sistemas de expresión habituales incluyen células hospedadoras de *E. coli* y vectores plasmídicos, células hospedadoras de insecto y vectores de baculovirus y células hospedadoras de mamífero y vectores.

Los agentes descritos en este documento (por ejemplo, anticuerpos, proteínas tales como formas mutantes sin señalización de G-CSF, moléculas químicas pequeñas, receptores solubles, etc.) pueden suministrarse convenientemente en composiciones farmacéuticas.

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

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con el ingrediente activo y opcionalmente con otros ingredientes activos según lo necesario, seguido por esterilización por filtración o por otros medios apropiados de esterilización. En el caso de polvos

estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos adecuados de preparación incluyen secado al vacío y la técnica de secado por congelación que produce un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente adicionalmente deseado.

5 Cuando el modulador está protegido adecuadamente, se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o puede encerrarse en una capsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o puede comprimirse en comprimidos, o puede incorporarse directamente con el alimento de la dieta o administrarse a través de leche materna. Para la administración terapéutica oral, el ingrediente activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, capsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos un 1 % en peso del modulador. El porcentaje de las composiciones y preparaciones pueden variarse, por supuesto, y puede ser convenientemente entre aproximadamente el 5 a aproximadamente el 80 % del peso de la unidad. La cantidad de modulador en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones pueden prepararse de modo que una forma unitaria de dosificación oral contiene entre aproximadamente 0,1 µg y 200 mg de modulador. Las cantidades de dosificación alternativas incluyen de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1000 mg y de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 500 mg. Estas dosificaciones pueden ser por individuo o por kg de peso corporal. La administración puede ser por hora, día, semana, mes o año.

20 Los comprimidos, trociscos, cápsulas, cremas y similares también pueden contener los componentes en enumerados a continuación en este documento. Puede añadirse un aglutinante tal como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Puede haber presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto o compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

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

40 Como se indica anteriormente, la administración puede ser por cualquier medio.

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

50 Un médico o un veterinario experto en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el medio o el veterinario podría empezar con dosis del anticuerpo anti-G-CSF/G-CSFR para su uso en la presente invención, empleadas en las composiciones farmacéuticas a niveles inferiores que las requeridas para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención puede ser esa cantidad del compuesto que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea por inyección, preferiblemente proximal al sitio de la diana (por ejemplo, pulmón). Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día.

60 Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos anti-G-CSF/G-CSFR se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tal como las analizadas anteriormente, incluyendo aquellas que pueden administrarse a un ser humano por vía intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo.

65 Los modelos animales útiles para ensayar la inhibición de G-CSF o su receptor, u otros enfoques para antagonizar la señalización mediada por G-CSF, incluyen el modelo de encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE).

Como se analiza en los siguientes ejemplos, la supresión de G-CSF con un antagonista de ensayo tuvo un impacto significativo sobre la cantidad de neutrófilos en el modelo de EAE y redujo el nivel de enfermedad en el modelo. Como los neutrófilos son mediadores clave de la inflamación del SNC, la reducción significativa en las cantidades de neutrófilos inducida por el antagonista de G-CSF en el modelo de EAE indica que el antagonismo de la actividad G-CSF es un enfoque terapéutico útil.

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes Ejemplos no limitantes. En los Ejemplos, se emplean los siguientes materiales y métodos.

## 10 Animales

Se usaron ratones hembra C57Bl/6 o ratones G-CSF KO (proporcionados por A. Dunn, Ludwig Institute for Cancer Research, Parkville, Australia).

## 15 Administración de fármacos

Se dio a los ratones las dosis especificadas de anticuerpo de control de isotipo o anti-G-CSF (como se resume en la sección 1) una vez al día, administrado por inyección i.v.

## 20 Anticuerpos

Para el análisis de la cantidad de neutrófilos, se adquirieron anticuerpos anti-CD11b (M1/70) y anti-GR (1A8) de BD pharmingen (San Diego, CA, EE. UU.). El HRPN de control de isotipo (IgG1 de rata) se adquirió de BioXcell (West Lebanon, NH, EE. UU.). El anticuerpo neutralizante anti-G-CSF (MAB414) se adquirió de R&D systems (Minneapolis, MN, EE. UU.).

## Encefalomiélitis autoinmunitaria experimental (EAE)

La EAE se indujo en ratones hembra con edad de 8-12 semanas. Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con 100 µg de péptido<sub>35-55</sub> de mielina MOG (Mimotopes, Clayton, Vic, Australia) emulsionado en CFA (Difco, BD San Diego, CA, EE. UU.), seguido por 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) administrada por vía intravenosa en el día 0 y en el día 2. Se evaluó el valor de parálisis clínica como se describe previamente (Langrish et al., J Exp Med 201(2):233-40, 2005) con un valor máximo de 6 para cada ratón.

## 35 Evaluación de la cantidad de neutrófilos

Para el análisis de la cantidad de neutrófilos durante el tratamiento anti-G-CSF en EAE, los animales se sacrificaron en el día 0 (sin tratamiento), en el día 7, en el día 14 y en el día 21. Se prepararon suspensiones de células individuales de bazo y LN cervical y se eliminaron los glóbulos rojos por lisis hipotónica con tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.). Para el análisis de la sangre, los glóbulos rojos se eliminaron por lisis hipotónica. Para el análisis de médula ósea, se retiraron los fémures y se lavaron abundantemente con PBS enfriado en hielo y se eliminaron los glóbulos rojos por lisis hipotónica. Para el análisis de células del SNC, se aislaron las células mononucleares como se describe previamente (Langrish et al., 2005 *supra*). Las suspensiones de células individuales de bazo, sangre, ganglio linfático, médula ósea y células del SNC se tiñeron con anticuerpos anti-CD11b y GR1 (dilución 1/100), se lavaron y se procesaron en FACS Canto (BD, San Jose, CA, EE. UU.). Los datos se analizaron usando el software Flowjo (Treestar, Ashland OR, EE. UU.).

## Reactivación de células T y ensayos de citoquinas

Se recogieron LN de bazo, inguinal, auxiliar y braquial de ratones 10 días después de la inmunización subcutánea con MOG/CFA. Las células se aislaron por homogeneización a través de un filtro de 70 µm, después se lavaron dos veces en medio y se combinaron para cada grupo de tratamiento. Las células T CD4+ entonces se purificaron por selección MACS positiva de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La pureza de las células T fue de >95 % CD4+ determinada por FACS. Se cultivaron  $2 \times 10^5$  células T CD4+ purificadas con  $2 \times 10^5$  esplenocitos irradiados en 0,2 ml en pocillos triplicados en placas de 96 pocillos con 100 µg/ml de péptido MOG<sub>35-55</sub> durante 3 días. Se recogió el sobrenadante y se midieron las citoquinas por ensayo Milliplex (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) en un instrumento Luminex 200 (Austin, TX, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 60 Análisis estadístico

Se realizó un ensayo de Mann-Whitney bilateral usado para generar el análisis estadístico usando el software Prism [Marca Registrada].

65

## Ejemplo 1

Los ratones deficientes en G-CSF están protegidos de signos clínicos de enfermedad en el modelo de EAE de inflamación autoinmunitaria neurológica

Para ensayar la función de G-CSF en la inflamación autoinmunitaria neurológica se usó el modelo de ratón de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). La EAE es un modelo animal usado ampliamente que replica muchos de los signos clínicos e histopatológicos de EM y enfermedad de Devic incluyendo la degeneración de la función de las neuronas motoras.

La EAE se indujo en ratones de tipo silvestre (C57B1/6) o G-CSF knock out (KO). La enfermedad se controló desde el día 0 hasta el día 30 y se registró la parálisis clínica.

Se descubrió que los ratones deficientes en G-CSF (ratones G-CSF Knock-out, G-CSF KO) estaban protegidos de la disfunción progresiva de neuronas motoras (Figura 1). Esto indicaba que, *in vivo*, G-CSF desempeña una función pro-inflamatoria importante en los mecanismos patogénicos de la destrucción autoinmunitaria del SNC.

## Ejemplo 2

El bloqueo de G-CSF inhibe los signos clínicos de enfermedad en el modelo de EAE de inflamación autoinmunitaria neurológica

Para ensayar si la inhibición terapéutica de G-CSF era beneficiosa *in vivo*, se indujo EAE en ratones de tipo silvestre como se describe anteriormente y se trataron con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-G-CSF neutralizante. Se descubrió que el tratamiento de los ratones con un mAb anti-G-CSF neutralizante inhibía la progresión clínica de EAE (Figura 2). El anticuerpo anti-G-CSF no lograba la media en días de aparición clínica (valor 1) [Tabla 3] o la media en días hasta la enfermedad máxima (Tabla 4). Sin embargo, el tratamiento con un mAb anti-G-CSF neutralizante inhibía el valor clínico promedio y protegía a los animales de la parálisis progresiva (Tabla 5). Por lo tanto, la progresión de la enfermedad después de la aparición inicial se ralentiza.

TABLA 3

Media en días de aparición de la enfermedad	
Tratamiento	Media en días de aparición (+/- error típico)
Control de isotipo	7,25 (+/- 0,8)
Anti-G-CSF	8,8 (+/- 1,2)
*no significativo	

TABLA 4

Media en días hasta el valor clínico máximo	
Tratamiento	Media en días hasta el valor de enfermedad máxima (+/- error típico)
Control de isotipo	20,4 (+/- 1,4)
Anti-G-CSF	22,3 (+/- 2,1)
*no significativo	

TABLA 5

Valor clínico medio	
Tratamiento	Valor clínico máximo medio (+/- error típico)
Control de isotipo	5,7 (+/- 0,1)
Anti-G-CSF	3,0 (+/- 0,7)
*p = 0,005.	

## Ejemplo 3

El tratamiento anti-G-CSF inhibe los neutrófilos inducidos por enfermedad en el modelo de EAE de inflamación autoinmunitaria neurológica

Para evaluar el efecto del bloqueo de G-CSF sobre la cantidad de neutrófilos *in vivo*, se realizó un análisis del curso de tiempo durante el tratamiento con anticuerpo de control de isotipo o anti-G-CSF en el modelo de EAE descrito anteriormente. Los animales se sacrificaron en el día 0 (sin tratamiento), en el día 7, en el día 14 y en el día 21 y se evaluó la cantidad de neutrófilos.

Después de la inducción de EAE, la cantidad de neutrófilos aumentaba en la sangre, en la médula ósea, en el SNC, en el ganglio linfático y en el bazo (Figura 3). El tratamiento con anticuerpo anti-G-CSF inhibía la neutrofilia en todos estos sitios (Figura 3), coherente con una función clave para G-CSF en el control de las respuestas de neutrófilos *in vivo*.

5

## Ejemplo 4

*El tratamiento anti-G-CSF inhibe las citoquinas proinflamatorias de células T en el modelo de EAE de inflamación autoinmunitaria neurológica*

10

Las citoquinas de células T CD4<sup>+</sup> son reguladores importantes de la inflamación. Para dilucidar el efecto del tratamiento anti-G-CSF sobre esta ruta, se usaron células T CD4<sup>+</sup> purificadas de los bazos y los ganglios linfáticos de animales sacrificados en el día 10 de ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo o anti-G-CSF en el modelo de EAE descrito anteriormente, y se reactivaron las células T CDR4<sup>+</sup> purificadas con MOG y se analizó la expresión de citoquinas.

15

El tratamiento anti-G-CSF inhibía la expresión de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la reactivación. El tratamiento anti-G-CSF reducía la expresión de IL-6, TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL-17, todas citoquinas importantes para dirigir la EAE (Figura 4). El tratamiento anti-G-CSF también inhibía la expresión de quimioquinas de la familia CC importantes para el reclutamiento de células durante la inflamación neurológica (Boven et al., Clin Exp Immunol 122(2):257-63, 2000). La expresión de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 y RANTES por células T CD4<sup>+</sup> durante la reactivación se inhibía por el tratamiento anti-G-CSF *in vivo* (Figura 4).

20

## Ejemplo 5

25

*Inhibición de la proliferación mediada por G-CSF en células Ba/F3 que expresan el receptor de hG-CSF por diversos antagonistas de G-CSF*

Se cultivaron células BaF3 transfectadas de forma estable con hG-CSFR como se describe por Layton et al., J. Biol. Chem. 272:29735-29741, 1997 en placas de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en medio DMEM con FBS al 5 % v/v y 0,5 ng/ml de rh o mG-CSF (R&D Systems n.º cat. 214-CS y n.º cat. 414-CS respectivamente). Se añadieron antagonistas de G-CSF (R&D Systems MAB414, mAb711 anti-hG-CSFR y hG-CSFR-Fc) a dosis de titulación de factor tres partiendo de 1  $\mu$ M y se midió la proliferación celular por reducción de MTS (Cory et al., Cancer Commun. 3:207-12, 1991; Riss y Moravec, Mol. Cell Biol. 3(1):184a, 1993) después de 48 horas de cultivo.

30

35

## A. Inhibición por anticuerpo anti-G-CSF:

El anticuerpo anti-G-CSF era capaz de inhibir la proliferación de mG-CSF con una CI<sub>50</sub> de 10 pM.

40

## B. Inhibición por anticuerpo anti-hG-CSFR:

Un anticuerpo monoclonal murino contra el receptor de hG-CSF, mAb711, (Layton *et al.*, *supra* 1997) y su derivado humanizado eran capaces de inhibir la proliferación de mG-CSF con una CI<sub>50</sub> de 1,1 nM y 1,5 nM respectivamente.

45

Un anticuerpo quimérico que comprendía las regiones variables de cadena pesada y ligera de mAb711 y las regiones constantes de cadena pesada y ligera de IgG1 humana inhibían la actividad G-CSF con una CI<sub>50</sub> similar al anticuerpo monoclonal murino mAb711.

## C. Inhibición por proteína hG-CSFR-Fc soluble:

50

Una proteína G-CSFR-Fc soluble (Honjo et al., Acta Cryst F61:788-790, 2005) era capaz de inhibir la proliferación de mG-CSF con una CI<sub>50</sub> de 22 pM.

Estos resultados demuestran que la actividad biológica de G-CSF se inhibe por una diversidad de antagonistas, incluyendo anticuerpos contra G-CSF, anticuerpos contra G-CSFR y receptores solubles de G-CSF.

55

## Bibliografía

- Alonso et al., Neurology 71(2): 129-35, 2008  
 Barahona-Garrido et al., Biologics 2(3):501-4, 2008  
 Bergamaschi et al., Neuroepidemiology 25(1): 15-8, 2005  
 Bialek et al., Infection 26(6):375-8, 1998  
 Bird, Science 242:423, 1988  
 Boven et al., Clin Exp Immunol 122(2):257-63, 2000  
 Brennan et al., Science 229:81, 1985  
 Bungart et al., British Journal of Haematology 22: 1156, 1990

60

65

- Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167, 1992  
 Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991  
 Colotta et al., *Blood* 80:2012-2020, 1992  
 Cory et al., *Cancer Commun.* 3:207-12, 1991  
 5 Dagia et al., *Nat Med* 12(10):1185-90, 2006  
 de Haan et al., *Blood* 86:2986-2992, 1995  
 Demetri et al., *Blood* 78:2791-2808, 1991  
 Dibbert et al., *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 96(23):13330-5, 1999  
 Eyles et al., *Blood* 112(13):5193-201, 2008  
 10 Frank et al., *BMC Neurosci* 10:49, 2009  
 Geng et al., *Molecular Immunology* 44:5121-529, 2007  
 Gericke et al., *Journal of Leukocyte Biology* 57:455-461, 1995  
 Hadaya et al., *JAutoimmun* 24(2):125-34, 2005  
 Honjo et al., *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 61(Pt 8):788-790, 2005  
 15 Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 85:5879, 1988  
 Jacob et al., *Blood* 92:353-361, 1998  
 Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986  
 Kabat et al. en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., US Department of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación NIH n.º 91-3242, 1991  
 20 Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-499, 1975  
 Kortt et al., *Protein Engineering* 10:423, 1997  
 Kudo et al., *Scand J Gastroenterol* 43(6):689-97, 2008  
 Langrish et al., *J Exp Med* 201(2):233-40, 2005  
 Larrick et al., *Bio/Technology* 7:934, 1989  
 25 Layton et al., *J. Biol. Chem.* 272:29735-29741, 1997  
 Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 84:3439, 1987  
 Lopez-Diego et al., *Nat Rev Drug Discov* 7(11): 909-25, 2008  
 Lord et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 86:9499-9503, 1989  
 McColl et al., *J Immunol* 161(11):6421-6, 1998  
 30 Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991  
 Metcalf, *International Journal of Cancer* 25:225, 1980  
 Morales et al., *Adv Neurol* 98:27-45, 2006  
 Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117, 1992  
 Morrison et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, 1984  
 35 Nicola et al., *Journal of Biological Chemistry* 258:9017, 1983  
 Nicola et al., *Nature* 314:625, 1985  
 Openshaw et al., "*Neurology* 54(11):2147-50, 2000  
 Padlan et al., *Mol.Immunol.* 28:489- 498, 1991  
 Pedersen et al., *J. Mol. Biol.* 235:959-973, 1994  
 40 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992  
 Ragonese et al., *Eur J Neurol* 15(2):123-7, 2008  
 Reichmann et al., *Nature* 332:323-329, 1988  
 Rex et al., *Transfusion* 35:605-611, 1995  
 Riss and Moravec, *Mol. Cell Biol.* 3(1):184a, 1993  
 45 Roberts et al., *Blood* 89:2736-2744, 1997  
 Rutella et al., *Transplantation* 84(Supl. 1):S26-30, 2007  
 Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II, D. N. Glover ed. 1985 y Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1994  
 50 Snir et al., *J Neuroimmunol* 172(1-2):145-55, 2006  
 Souza et al., *Science* 232:61, 1986  
 Summerton and Weller, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 7:187-195, 1997  
 Ward et al., *Nature* 334:544, 1989  
 Weiner et al., *J Neurol* 255(Supl. 1): 3-11, 2008  
 55 Welte et al., *Blood* 88:1907-1929, 1996  
 Wingerchuk et al., *Lancet Neurol* 6(9):805-15, 2007  
 Wingerchuk et al., *Curr Treat Options Neurol* 10(1):55-66, 2008  
 Winter y Harris, *TIPS* 14:139, 1993; Carter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89:4285 1992  
 Xu et al., *British Journal of Haematology* 93:558-568, 1996  
 60 Yong et al., *European Journal of Haematology* 49:251-259, 1992  
 Yong, *British Journal of Haematology* 94:40-47, 1996  
 Zavala et al., *J Immunol* 168(4):2011-9, 2002  
 Zehntner et al., *J Immunol* 174(8):5124-31, 2005

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CSL LIMITED

5 <120> TRATAMIENTO DE AFECCIONES NEUROLÓGICAS

<130> 42.20.112335

<150> US 61/242.503

10 <151> 15-09-2009

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 204

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

ES 2 623 802 T3

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu  
 100 105 110

Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

5

<400> 2

ES 2 623 802 T3

ggagcctgca gccagccccc acccagaccc atggctggac ctgccacca gagccccatg 60  
 aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc 120  
 acccccctgg gcctgccag ctccctgcc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa 180  
 gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag 240  
 ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc 300  
 ctgagcagct gccccagcca ggcctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc 360  
 ggccctttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt 420  
 cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccacccat ctggcagcag 480  
 atggaagaac tgggaatggc ccctgcctcg cagcccaccc agggtgccat gccggccttc 540  
 gcctctgctt tccagcgcg ggcaggaggg gtcctagtgt cctcccctct gcagagcttc 600  
 ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac cttgcccagc cctgagccaa gccctcccca 660  
 tcccattgat ttatctctat ttaatatatta tgtctattta agcctcatat ttaaagacag 720  
 ggaagagcag aacggagccc caggcctctg tgccttccc tgcatctctg agtttcattc 780  
 tctgcctgt agcagtgaga aaaagctcct gtcctcccat ccctggact gggaggtaga 840  
 taggtaata ccaagtattt attactatga ctgtcccca gccctggctc tgcaatgggc 900  
 actgggatga gccgctgtga gccctggctc ctgagggtcc ccacctggga cccttgagag 960  
 tatcaggtct cccacgtggg agacaagaaa tcctgttta atatttaaac agcagtgttc 1020  
 cccatctggg tecttgacc cctcactctg gcctcagccg actgcacagc ggcccctgca 1080  
 tccccttggc tgtgaggccc ctggacaagc agaggtggcc agagctggga ggcatggccc 1140  
 tggggtccca cgaatttgcg ggggaatctc gtttttcttc ttaagacttt tgggacatgg 1200  
 tttgactccc gaacatcacc gacgcgtctc ctgtttttct ggggtggctc gggacacctg 1260  
 ccctgcccc acgaggggtca ggactgtgac tcttttttagg gccaggcagg tgcttgaca 1320  
 tttgccttgc tggacgggga ctggggatgt gggagggagc agacaggagg aatcatgtca 1380  
 ggctgtgtg tgaaggaag ctccactgtc accctccacc tcttcacccc cactcacca 1440  
 gtgtcccctc cactgtcaca ttgtaactga acttcaggat aataaagtgc ttgcctcc 1498

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

5

<400> 3

ES 2 623 802 T3

```

acccccctgg gccctgccag ctccctgccc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa      60
gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag      120
ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc      180
ctgagcagct gccccagcca ggcctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc      240
ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt      300
cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccaccat ctggcagcag      360
atggaagaac tgggaatggc cctgcctctg cagcccaccc agggtgccat gccggccttc      420
gcctctgctt tccagcgcg ggcaggaggg gtcttagttg cctcccatct gcagagcttc      480
ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac cttgccccagc cctga                      525

```

<210> 4  
 <211> 174  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

5

```

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

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
20          25          30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
35          40          45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50          55          60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
65          70          75          80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
85          90          95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
100         105         110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
115         120         125

```

10

ES 2 623 802 T3

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe  
130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe  
145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
165 170

<210> 5

<211> 863

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 623 802 T3

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

ES 2 623 802 T3

Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala  
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 623 802 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 623 802 T3

Cys Val Gln Asp Ala Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile  
 705 710 715 720  
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp  
 725 730 735  
 Glu Ser His Asn Ser Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln  
 740 745 750  
 Thr Tyr Val Leu Gln Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln  
 755 760 765  
 Ser Gln Ser Gly Thr Ser Asp Gln Val Leu Tyr Gly Gln Leu Leu Gly  
 770 775 780  
 Ser Pro Thr Ser Pro Gly Pro Gly His Tyr Leu Arg Cys Asp Ser Thr  
 785 790 795 800  
 Gln Pro Leu Leu Ala Gly Leu Thr Pro Ser Pro Lys Ser Tyr Glu Asn  
 805 810 815  
 Leu Trp Phe Gln Ala Ser Pro Leu Gly Thr Leu Val Thr Pro Ala Pro  
 820 825 830  
 Ser Gln Glu Asp Asp Cys Val Phe Gly Pro Leu Leu Asn Phe Pro Leu  
 835 840 845  
 Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly Met Glu Ala Leu Gly Ser Phe  
 850 855 860

<210> 6  
 <211> 3024  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

5

ES 2 623 802 T3

gaagctggac tgcagctggt ttcaggaact tctcttgacg agaagagaga ccaaggaggc	60
caagcagggg ctgggccaga ggtgccaca tggggaaact gaggctcggc tcggaaaggt	120
gaagtaactt gtccaagatc acaaagctgg tgaacatcaa gttggtgcta tggcaaggct	180
gggaaactgc agcctgactt gggctgccct gatcatcctg ctgctccccg gaagtctgga	240
ggagtgcggg cacatcagtg tctcagcccc catcgtccac ctgggggatc ccatcacagc	300
ctcctgcac atcaagcaga actgcagcca tctggaccog gagccacaga ttctgtggag	360
actgggagca gagcttcagc cggggggcag gcagcagcgt ctgtctgatg ggaccaggga	420
atctatcacc accctgcccc acctcaacca cactcaggcc tttctctect gctgectgaa	480
ctggggcaac agcctgcaga tectggacca ggttgagctg cgcgcaggct accctccagc	540
catacccccac aacctctect gcctcatgaa cctcacaacc agcagcctca tctgccagtg	600

ES 2 623 802 T3

ggagccagga cctgagacc acccaccac cagcttcact ctgaagagtt tcaagagccg 660  
 gggcaactgt cagacccaag gggactccat cctggactgc gtgccaagg acgggcagag 720  
 ccactgctgc atcccacgca aacacctget gttgtaccag aatatgggca tctgggtgca 780  
 ggcagagaat gcgctgggga ccagcatgtc cccacaactg tgtcttgatc ccatggatgt 840  
 tgtgaaactg gagccccca tgctgaggac catggacccc agccctgaag cggccoctcc 900  
 ccaggcagge tgcctacagc tgtgctggga gccatggcag ccaggcctgc acataaatca 960  
 gaagtgtgag ctgcccaca agccgcagcg tggagaagcc agctgggcac tgggtggccc 1020  
 cctccccttg gaggccctc agtatgagct ctgcccgtc ccccagcca cggcctacac 1080  
 cctgcagata cgctgcatcc gctggcccct gcctggccac tggagcgact ggagccccag 1140  
 cctggagctg agaactaccg aacgggcccc cactgtcaga ctggacacat ggtggcggca 1200  
 gaggcagctg gaccccagga cagtgcagct gttctggaag ccagtgcccc tggaggaaga 1260  
 cagcggacgg atccaagggt atgtggtttc ttggagacc tcaggccagg ctggggccat 1320  
 cctgcccctc tgcaacacca cagagctcag ctgcacctc cacctgcctt cagaagccca 1380  
 ggaggtggcc cttgtggcct ataactcagc cgggacctct cgcgccccc cgggtggtctt 1440  
 ctcagaaagc agaggcccag ctctgaccag actccatgcc atggcccag accctcacag 1500  
 cctctgggta ggctgggagc ccccacatcc atggcctcag ggetatgtga ttgagtgggg 1560  
 cctgggcccc ccagcggga gcaatagcaa caagacctgg aggatggaac agaatgggag 1620  
 agccacgggg tttctgctga aggagaacat caggcccttt cagctctatg agatcatcgt 1680  
 gactcccttg taccaggaca ccatgggacc ccccagcat gtctatgcct actctcaaga 1740  
 aatggctccc tccatgccc cagagctgca tctaaagcac attggcaaga cctgggcaca 1800  
 gctggagtgg gtgcctgagc cccctgagct ggggaagagc ccccttacc actacacat 1860  
 cttctggacc aacgctcaga accagtcctt ctcggccatc ctgaatgcct cctcccgtgg 1920  
 ctttgcctc catggcctgg agcccgccag tctgtatcac atccacctca tggtgccag 1980  
 ccaggctggg gccaccaaca gtacagtcct caccctgatg acctgacc cagaggggtc 2040  
 ggagetacac atcctctgg gctgttcgg cctctgctg ttgctcacct gcctctgtgg 2100  
 aactgcctgg ctctgttgca gcccacacag gaagaatccc ctctggcaa gtgtcccaga 2160  
 cccagctcac agcagcctgg gctcctgggt gccacaatc atggaggagc tgcccggacc 2220  
 cagacagggg cagtggctgg ggcagacatc tgaaatgagc cgtgctctca ccccacatcc 2280  
 ttgtgtgcag gatgcctcc agctgccgg ccttggcag ccacccatca ccaagctcac 2340  
 agtgcctggg gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag tccataaca gctcagagac 2400  
 ctgtggcctc cccactctgg tccagacctg tgtgctccag ggggaccaa gagcagtttc 2460  
 caccagccc caatcccagt ctggcaccag cgatcaggtc ctttatgggc agctgctggg 2520

ES 2 623 802 T3

cagccccaca agcccagggc cagggcacta tctcogctgt gactccactc agcccctctt 2580  
 ggggggctc acccccagcc ccaagtecta tgagaacctc tggttccagg ccagcccctt 2640  
 ggggacctg gtaaccccag cccaagcca ggaggacgac tgtgtctttg ggccactgct 2700  
 caacttcccc ctctgcagg ggatccgggt ccatgggatg gagggcgtgg ggagcttcta 2760  
 gggcttctg gggttccctt cttgggctg cctcttaaag gcctgagcta gctggagaag 2820  
 aggggagggt ccataagccc atgactaaaa actaccocag cccaggctct caccatctcc 2880  
 agtcaccagc atctccctct cctcccaatc tccataggct gggcctccca ggcgatctgc 2940  
 atactttaag gaccagatca tgctccatcc agccccacce aatggccttt tgtgcttggt 3000  
 tcctataact tcagtattgt aaac 3024

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

5

<400> 7

gagtgcgggc acatcagtgt ctacgcccc atcgtccacc tgggggatcc catcacagcc 60  
 tcttgcata tcaagcagaa ctgcagccat ctggaccocg agccacagat tctgtggaga 120  
 ctgggagcag agcttcagcc cgggggagcag cagcagcgtc tgtctgatgg gaccagcagaa 180  
 tctatcatca cctgccccca cctcaaccac actcaggcct ttctctctg ctgcctgaac 240  
 tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc gcgcaggcta ccctccagcc 300  
 ataccacaca acctctctg cctcatgaac ctcaacaaca gcagcctcat ctgccagtgg 360  
 gagccaggac ctgagaccca cctaccacc agcttcactc tgaagagttt caagagccgg 420  
 ggcaactgtc agacccaagg ggactccatc ctggactgcg tgcccaagga cgggcagagc 480  
 cactgctgca tcccacgcaa acacctgctg ttgtaccaga atatgggcat ctgggtgcag 540  
 gcagagaatg cgtgggggac cagcatgtcc ccacaactgt gtcttgatcc catggatggt 600  
 gtgaaactgg agccccccat gctgcggacc atggacccca gccctgaagc ggcccctccc 660  
 caggcaggct gcctacagct gtgctgggag ccatggcagc caggcctgca cataaatcag 720  
 aagtgtgagc tgcgccacaa gccgcagcgt ggagaagcca gctgggcact ggtgggcccc 780  
 ctccccttgg aggcccttca gtatgagctc tgcgggctcc tcccagccac ggcctacacc 840  
 ctgcagatac gctgcatacc ctggcccctg cctggocact ggagcgactg gagccccagc 900  
 ctggagctga gaactaccga acgggcccc actgtcagac tggacacatg gtggcggcag 960  
 aggcagctgg accccaggac agtgcagctg ttctggaagc cagtgccctt ggaggaagac 1020  
 agcggacgga tccaaggtta tgtggtttct tggagaccct caggccaggc tggggccatc 1080  
 ctgcccctct gcaacaccac agagctcagc tgcaccttcc acctgccttc agaagcccag 1140  
 gaggtggccc ttgtggccta taactcagcc gggacctctc gcccccaccc ggtggtcttc 1200

10

ES 2 623 802 T3

tcagaaagca gaggcccagc tctgaccaga ctccatgcca tggcccgaga ccctcacagc	1260
ctctgggtag gctgggagcc ccccaatcca tggcctcagg gctatgtgat tgagtggggc	1320
ctgggcccc ccagcgcgag caatagcaac aagacctgga ggatggaaca gaatgggaga	1380
gccacggggt ttctgctgaa ggagaacatc aggcccttc agctctatga gatcatcgtg	1440
actcccttgt accaggacac catgggaccc tcccagcatg tctatgccta ctctcaagaa	1500
atggctccct cccatgcccc agagctgcat ctaaagcaca ttggcaagac ctgggcacag	1560
ctggagtggg tgctgagcc cctgagctg gggaagagcc ccctaccca ctacaccatc	1620
ttctggacca acgctcagaa ccagtccttc tccgccatcc tgaatgcctc ctcccgtggc	1680
tttgtectcc atggcctgga gcccgccagt ctgtatcaca tccacctcat ggctgccagc	1740
caggctgggg ccaccaacag tacagtcctc accctgatga cettgacccc agaggggtcg	1800
gagctacaca tcatcctggg cctgttcggc ctctgctgt tgctcacctg cctctgtgga	1860
actgcctggc tctgttgag ccccaacagg aagaatcccc tctggccaag tgtcccagac	1920
ccagctcaca gcagcctggg ctctgggtg ccacaatca tggaggagct gcccgaccc	1980
agacagggac agtggctggg gcagacatct gaaatgagcc gtgctctcac cccacatcct	2040
tgtgtgcagg atgccttcca gctgcccggc ettggaacgc caccatcac caagctcaca	2100
gtgctggagg aggatgaaa gaagccggtg ccctgggagt ccataacag ctcagagacc	2160
tgtggectcc ccaactctggc ccagacctat gtgctccagg gggacccaag agcagtttc	2220
accagcccc aatcccagtc tggcaccagc gatcaggctc tttatgggca gctgctgggc	2280
agccccacaa gccagggcc agggcactat ctccgctgtg actccactca gccctcttg	2340
gctggcctca ccccagccc caagtctat gagaacctct ggtccaggc cagccccttg	2400
gggacctgg taaccccagc cccaagccag gaggacgact gtgtctttgg gccactgctc	2460
aacttecccc tctgcaggg gatccgggtc catgggatgg aggcgctggg gagcttctag	2520

<210> 8  
 <211> 839  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8

5



ES 2 623 802 T3

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

ES 2 623 802 T3

Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro  
 325 330 335  
 Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg  
 340 345 350  
 Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu  
 355 360 365  
 Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu  
 370 375 380  
 Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe  
 385 390 395 400  
 Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg  
 405 410 415  
 Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro  
 420 425 430  
 Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn  
 435 440 445  
 Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe  
 450 455 460  
 Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val  
 465 470 475 480  
 Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala  
 485 490 495  
 Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys  
 500 505 510  
 His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro  
 515 520 525  
 Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn  
 530 535 540  
 Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly  
 545 550 555 560  
 Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu  
 565 570 575

ES 2 623 802 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

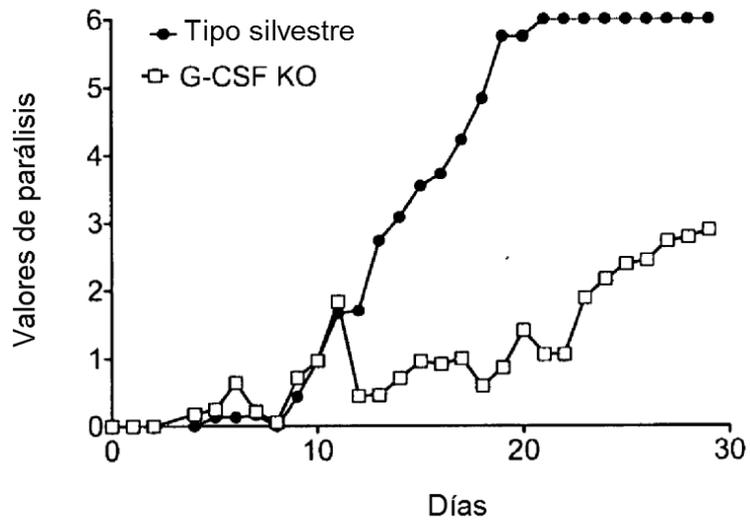
Gly Pro Leu Leu Asn Phe Pro Leu Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly  
820 825 830

ES 2 623 802 T3

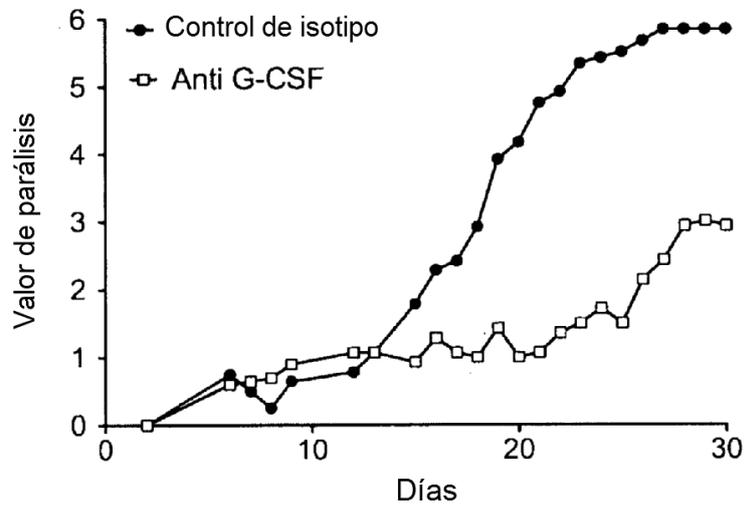
**Met Glu Ala Leu Gly Ser Phe**  
835

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un agente que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 a) un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR o un fragmento de unión a G-CSF o a G-CSFR del mismo; y  
b) un G-CSFR soluble o una parte de unión a G-CSF del mismo.
- 15 2. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC está asociada con infiltración de neutrófilos.
- 20 3. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC se selecciona del grupo que consiste en: esclerosis múltiple (EM); enfermedad de Devic; y una infección vírica del cerebro.
- 25 4. El agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sujeto es un mamífero.
- 30 5. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el sujeto es un primate o un roedor.
- 35 6. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el primate es un ser humano o el roedor es un ratón.
- 40 7. El agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente es un anticuerpo específico para G-CSF o para G-CSFR.
- 45 8. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.
- 50 9. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
10. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano.
11. Una composición farmacéutica que comprende un agente para su uso en el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, en la que la afección neurodegenerativa inflamatoria, el sujeto y el agente son como se define en una o más de las reivindicaciones 1 a 10.
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende adicionalmente un agente terapéutico seleccionado de la lista que consiste en: un agente antiinflamatorio; un agente inmunosupresor; y otro agente usado en el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC.
13. Uso de un agente que inhibe la actividad de G-CSF o de G-CSFR en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección neurodegenerativa inflamatoria del SNC en un sujeto, en el que la afección neurodegenerativa inflamatoria, el sujeto y el agente son como se define en una o más de las reivindicaciones 1 a 10.



**Figura 1**



**Figura 2**

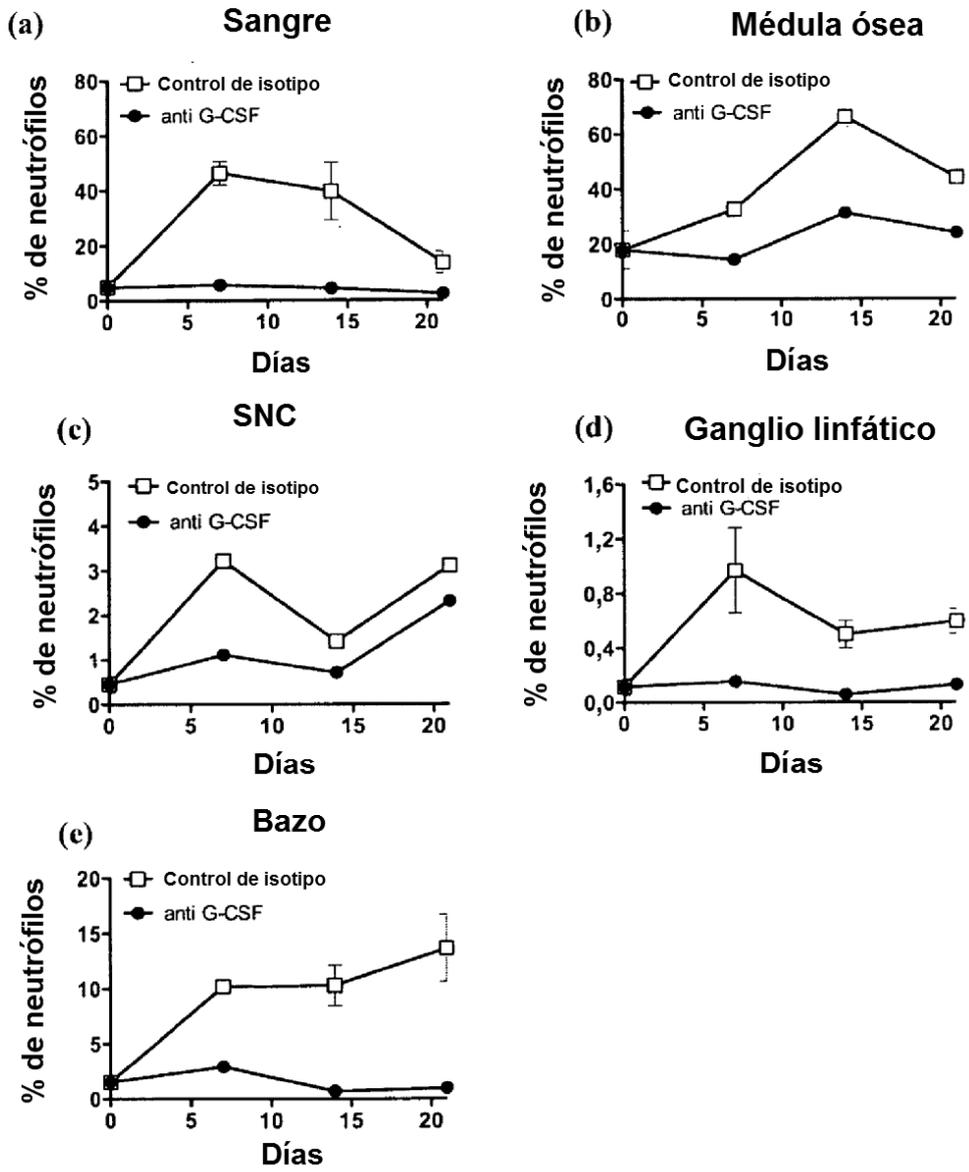


Figura 3

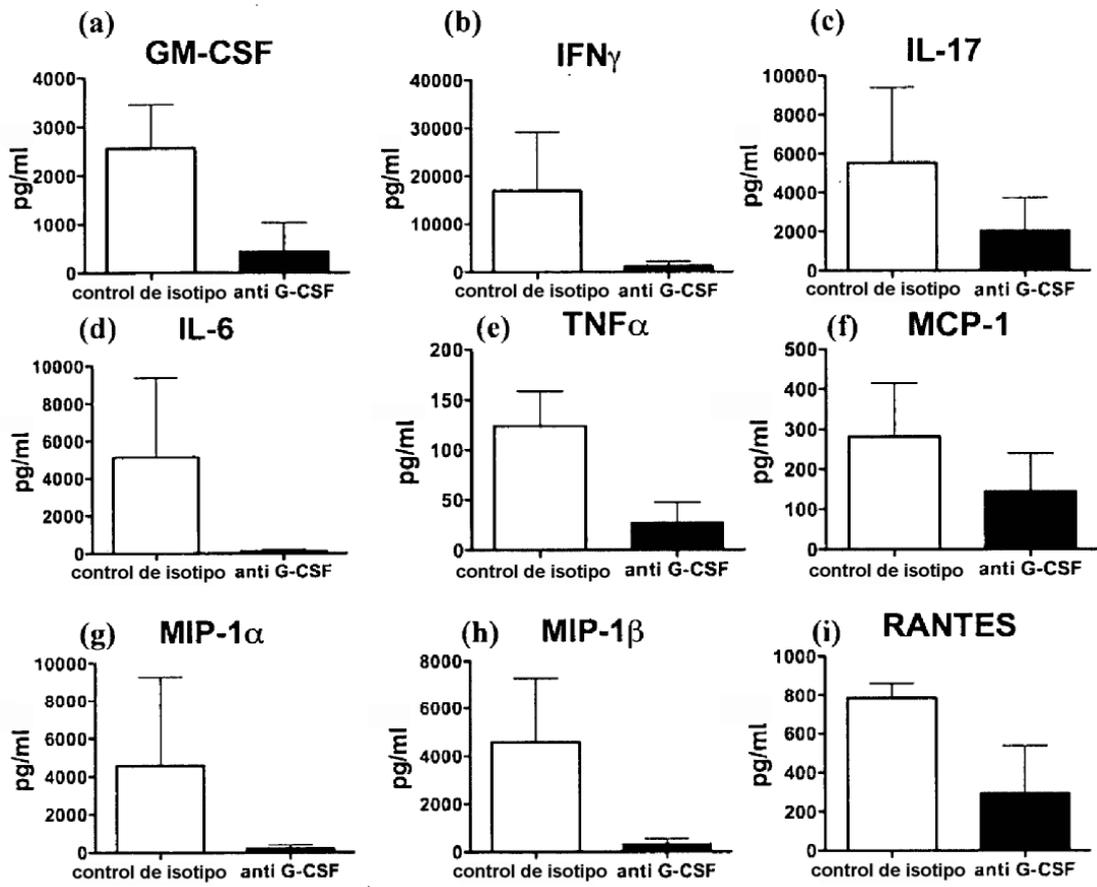


Figura 4