

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 551**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2012 PCT/EP2012/052043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12110360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2012 E 12707246 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2675826**

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

30 Prioridad:

14.02.2011 US 201113026944

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

14.02.2018

73 Titular/es:

**TRANSGENE SA (100.0%)
Boulevard Gonthier d'Andernach Parc
d'Innovation, CS80166
67405 Illkirch Graffenstaden Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**HAEGEL, HÉLÈNE;
THIOUDELLET, CHRISTINE;
GEIST, MICHEL;
GRELLIER, BENOÎT y
MARCHAND, JEAN-BAPTISTE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 654 551 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra el CSF-1R

El CSF-1 (Factor-1 estimulador de colonias) es una citoquina expresada particularmente por diversos tipos de células. Es un factor de diferenciación, crecimiento y supervivencia del linaje de fagocitos mononucleares que expresa el receptor de CSF-1 (CSF-1R) (SHERR. Colony-stimulating factor-1 receptor. Blood.1990, vol. 75, n.º 1, págs. 1-12). CSF-1R es un receptor de la tirosina quinasa codificado por el protooncogén *c-fms* que contiene un dominio de la quinasa intracelular y una región extracelular de unión a ligando organizado en cinco subdominios análogos a inmunoglobulina. La respuesta a CSF-1 da como resultado una mayor supervivencia, crecimiento, diferenciación, y cambios reversibles en la función. El gen *c-fms* es por sí mismo un marcador de diferenciación de macrófagos. La extensión de la expresión de *c-fms* es más fuerte que la de otros genes específicos de macrófagos incluyendo la lisozima y una proteína tirosina fosfatasa específica de macrófagos (HUME, y col. Regulation of CSF-1 receptor expression. Molecular reproduction and development. 1997, vol. 46, n.º 1, págs. 46-52).

Además de las células del linaje fagocítico mononuclear, el CSF-1R se expresa también en muchos tipos de tumores humanos. En cáncer de mama, la expresión de CSF-1R está asociada con tamaños tumorales más grandes y supervivencia menor (KLUGER, y col. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. Clinical Cancer research, 2004, vol. 10, n.º 1, págs. 173-7. ; SCHOOL, y col. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. Journal of the National Cancer Institute. 1994, vol. 86, n.º 2, págs.120-6). En el cáncer de ovario epitelial, la mayoría de los tumores y metástasis primarios expresa fuertemente el CSF-1R, y las metástasis expresan frecuentemente de forma simultánea CSF-1 y CSF-1R. El CSF-1R se expresa también por macrófagos que se infiltran en tumores (CHAMBERS, y col. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. Clinical Cancer Research. 1997, vol. 3, n.º 6, págs. 999-1007). En los cánceres de ovario y endometrial, el análisis por transferencia Northern muestra que la gran mayoría de tumores expresan de forma simultánea CSF-1 y CSF-1R, mientras que la expresión de CSF-1R se detecta solo débilmente en muestras de tejido endometrial normal (BAÏOCCHI, y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. Cancer. 1991, vol. 67, n.º 4, págs. 990-6). En carcinomas de cuello de útero, la expresión de CSF-1R está regulada en exceso en el estroma del tumor y en el epitelio del tumor, en comparación con el endometrio normal (KIRMA, y col. Elevated expression of the oncogene *c-fms* and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing *c-fms* expression. Cancer res. 2007, vol. 67, n.º 5, págs. 1918-26). En carcinoma renal, la infiltración de los macrófagos asociados a tumor que expresan altos niveles de CSF-1R está asociada con la progresión del tumor (HEMMERLEIN, y col. Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, *c-fms*, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. Cancer immunology, immunotherapy. 2000, vol. 49, n.º 9, págs. 485-92). CSF-1R se expresa en cerca del 100% de las neoplasias intraepiteliales prostáticas o en muestras de cánceres (IDE, y col. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 2002, vol. 99, n.º 22, págs. 14404-9). Se ha detectado también la expresión de CSF-1R en leucemias mielobásticas agudas y en leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B (RAMBALDI, y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and *c-fms* genes in human acute myeloblastic leukemia cells. Journal of Clinical Investigation. 1988, vol. 81, n.º 4, págs. 1030-5).

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

CSF-1 tiene también un efecto quimiotáctico sobre los precursores de la línea mieloide, que facilita la infiltración de

los monocitos en el tumor. No obstante, la presencia de estos monocitos no es suficiente para observar la destrucción del tumor por el sistema inmunitario (DORSCH, y col. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. European journal of immunology. 1993, vol. 23, n.º 1, págs. 186-90). Parece que en los contenidos de suero elevados comúnmente encontrados en
 5 pacientes que padecen tumores de mama, ovario o páncreas, CSF-1 orienta la diferenciación de estos monocitos en macrófagos y no en células dendríticas capaces de presentar antígenos tumorales e iniciar de esta manera una respuesta inmunitaria citotóxica eficaz dirigida contra las células tumorales (SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. Breast cancer research and treatment. 1996, vol. 39, n.º 3, págs. 275-83. ; BARON, y col. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from
 10 monocytes. Journal of cell science. 2001, vol. 114, n.º, pt5, págs. 999-1010).

CSF-1 es también esencial para la proliferación y diferenciación de osteoclastos (CECCHINI, y col. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. Molecular reproduction and development. 1997, vol. 46, n.º 1, págs. 75-83). Los osteoclastos son células multinucleadas que expresan el CSF-1R, derivando de precursores hematopoyéticos
 15 que son principalmente responsables de la degradación del hueso mineralizado durante el desarrollo, la homeostasis y la reparación del hueso. En diversos trastornos esqueléticos tales como osteoporosis, hipercalcemia de neoplasia maligna, artritis reumatoide, metástasis tumoral y enfermedad de Paget, la resorción del hueso por los osteoclastos excede la formación del hueso por los osteoblastos lo que conduce a una masa ósea disminuida, fragilidad esquelética y fractura de hueso (BRUZZANITI, y col. Molecular regulation of osteoclast activity. Reviews in endocrine. 2006, vol. 7, n.º 1-2, págs. 123-39). Por ejemplo, los pacientes con cáncer de mama avanzado desarrollan frecuentemente metástasis en el hueso. La metástasis ósea da como resultado un dolor intratable y un
 20 elevado riesgo de fracturas debido a la pérdida de hueso impulsada por el tumor (osteolisis), que está producida por una actividad osteoclástica aumentada (CICEK, y col. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. Cancer metastasis reviews. 2006, vol. 25, n.º 4, pág.635-44). Se ha mostrado que la osteolisis está vinculada a un elevado nivel de CSF-1 en circulación (KITAURA, y col. The journal of clinical investigation. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. 2005, vol. 115, n.º 12, págs.3418-27).

La ruta CSF-1 está también implicada en la mediación de la inflamación intestinal en la enfermedad tal como la enfermedad inflamatoria del intestino (MARSHALL, y col. Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-1) leads to inhibition of DSS-induced colitis. Inflammatory bowel diseases. 2007, vol. 13, n.º 2, págs. 219-24), en la mediación
 30 de la proliferación de macrófagos durante el rechazo agudo al aloinjerto (JOSE, y col. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. American journal of transplantation. 2003, vol. 3, n.º 3, págs. 294-300 en la replicación del VIH-1 en macrófagos infectados (KUTZA, y col. Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibits replication of HIV-1 in human macrophages. Journal of immunology. 2000, n.º 164, págs. 4955-4960).

35 Por estos motivos, se ha propuesto la inhibición de la actividad de la CSF-1 por diversos compuestos para el tratamiento del cáncer y la degradación del hueso.

Antecedentes de la técnica

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

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

45 El documento 20051068503 desvela un procedimiento para prevenir y tratar la osteolisis, la metástasis cancerosa y la pérdida de hueso asociada con la metástasis cancerosa administrando un anticuerpo contra CSF-1 a un sujeto.

El documento EP 1488792 A se refiere al uso de compuestos de arilo o heteroarilo monocíclicos y/o bicíclicos que presentan inhibición selectiva de la diferenciación, proliferación o liberación del mediador inhibiendo eficazmente la actividad tirosina quinasa de CSF-1R. Esta solicitud se refiere también al uso de dichos compuestos para la
 fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de células anómalas.

50 El documento US 2005059113 se refiere a anticuerpos y a porciones de unión a antígenos de los mismos que se unen específicamente a CSF-1. La invención se refiere también a anticuerpos humanos dirigidos contra CSF-1 y porciones de unión a antígenos de los mismos. Esta solicitud de invención proporciona también procedimientos de terapia génica que utilizan moléculas de ácidos nucleicos que codifican de inmunoglobulina pesada y/o ligera que comprenden los anticuerpos humanos dirigidos contra CSF-1.

55 Roussel y Sherr, 1989, PNAS, 86, 7924-7927 y Ashmun y col., 1989, Blood, 73, 827-837 desvelan anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor CSF-1 humano (por ejemplo, 12-3A3 y 2-4A5) que bloquean específicamente la unión de CSF-1 al receptor humano, inhibiendo por tanto el crecimiento dependiente de ligando. El epítipo reconocido se ha localizado entre las posiciones de aminoácidos 349-512.

El documento WO2009/026303 proporciona proteínas de unión a antígenos que son capaces de competir con CSF-1 y por tanto, evitan que CSF-1 se una a su receptor, y en determinadas realizaciones, inhibe la unión entre IL-34 y CSF-1R. Además, la sección experimental del documento WO2009/026303 indica que los anticuerpos desarrollados por los inventores son epítomos de unión que se localizan principalmente en el extremo N entre los aminoácidos 20 a 223 de la SEQ ID NO 29 (que corresponde al bucle 1 análogo a Ig y al bucle 2 análogo a Ig en el documento WO2009/026303) de CSF-1R y requiere la presencia de las regiones del bucle 1 análogo a Ig y del bucle 2 análogo a Ig.

El documento WO2009/112245 desvela las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos GXIIG6 de murino dirigidos contra CSF-1R y los anticuerpos GXIIG6 quiméricos que se unen a e inhiben la función de CSF-1R.

10 **Divulgación de la invención**

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente al CSF-1R y más específicamente a CSF-1R humano, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende:

- (i) (a) una primera región variable consistente en la SEQ ID NO 42 y (b) una segunda región variable consistente en la SEQ ID NO:44; o
- 15 (ii) (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO:43, y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:45; o
- (iii) (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO:42, y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:46.

20 Como se usa a lo largo de la aplicación completa, los términos "un" y "uno/a" se usan en el sentido de que significan "al menos uno", "al menos un primer", "uno o más" o "una pluralidad" de los componentes o etapas a las que se hace referencia, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo sus mezclas.

El término "y/o" donde sea que se use en el presente documento incluye el significado de "y", "o" y "todo o cualquier otra combinación de los elementos relacionados con dicho término".

25 El término "alrededor de" o "aproximadamente" como se usa en el presente documento significa comprendido en un 20%, preferentemente comprendido en un 10%, y más preferentemente comprendido en un 5% de un valor o intervalo dado.

30 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que los términos "comprender" y "comprende" signifiquen los kits de partes, productos, composiciones y procedimientos incluyan los componentes o etapas a los que se hace referencia, pero sin excluir otros. "Consiste esencialmente de" cuando se usa para definir productos, composiciones y procedimientos, significará excluir otros componentes o etapas de cualquier significancia esencial. Por tanto, una composición que consiste esencialmente de los componentes enumerados no excluiría contaminantes traza y vehículos farmacéuticamente aceptables. "Que consiste en" significará que excluye la mayoría de elementos traza de otros componentes o etapas.

35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de una proteína diana en la presencia de una población de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones de ensayo diseñadas, el anticuerpo de acuerdo con la invención se une preferentemente a al menos parte del CSF-1R y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de ensayo. La unión específica entre el anticuerpo de acuerdo con la invención y el CSF-1R significa que la afinidad de unión es de al menos 10^3 M^{-1} , y preferentemente 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} . En realizaciones particularmente ventajosas, la afinidad de unión es de al menos 10^9 M^{-1} o 10^{10} M^{-1} .

Tal como se usa en el presente documento, el término "CSF-1R" se refiere al receptor CSF1 humano. El receptor CSF-1 humano se ha secuenciado y su secuencia de aminoácidos se representa gráficamente en la SEQ ID NO: 29.

45 Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo" o "Ab" se usa en el sentido más amplio. Por tanto, un "anticuerpo" o "Ab" puede ser de origen natural o puede ser artificial tal como los anticuerpos monoclonales (mAb) producidos mediante tecnología de hibridoma convencional, tecnología recombinante y/o uno de sus fragmentos funcionales. Se entiende que los anticuerpos de la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina intactas, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (mAb), un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo humano, un anticuerpo animal (por ejemplo, un anticuerpo de camélido), anticuerpos quiméricos, así como sus porciones, fragmentos, regiones, péptidos y derivados (proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como, aunque no de forma limitativa, escisión enzimática, síntesis de péptidos, o técnicas recombinantes), tal como, por ejemplo, inmunoglobulina desprovista de cadenas ligeras (véase, por ejemplo, documento US 6.005.079), Fab, Fab', F (ab')₂, Fv, scFv, fragmento de anticuerpo, diacuerpo, Fd, regiones CDR, o cualquier porción o secuencia peptídica del anticuerpo que sea capaz de unirse al antígeno o el epítomo. Se dice que un anticuerpo es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar con la molécula para unirse por tanto a la molécula del anticuerpo. Los fragmentos o porciones de

anticuerpo pueden carecer del fragmento Fc de anticuerpo intacto, aclararse más rápidamente de la circulación, y puede tener menos unión a tejido no específica que un anticuerpo intacto. Los ejemplos de anticuerpos se pueden producir a partir de anticuerpos intactos usando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Wahl y col., 24 J. Nucl. Med. 316-25 (1983)). Pueden prepararse porciones de anticuerpos mediante cualquiera de los anteriores procedimientos, o pueden prepararse expresando una porción de la molécula recombinante. Por ejemplo, la(s) región(es) de un anticuerpo recombinante pueden aislarse y subclonarse en el vector de expresión adecuado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región variable" se refiere a la región, o dominio, variable, de la cadena ligera (VL) o la cadena pesada (VH) que contiene los determinantes para la especificidad de reconocimiento de la unión. Los dominios variables están implicados en el reconocimiento del antígeno y forman el sitio de unión a antígeno. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región marco" se refiere a porciones de regiones variables de la cadena ligera y pesada que son al menos un 85% homólogas (es decir, diferentes que las de las CDR) entre diferentes anticuerpos en la misma especie. Tal como se usa en el presente documento, el término "homólogo" se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que, cuando se alinean utilizando el algoritmo Smith-Waterman (SMITH, y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, n.º 147, págs.195-7), tienen aproximadamente el porcentaje designado de los mismos aminoácidos. Por ejemplo, "85% homólogo" se refiere a una comparación de los aminoácidos de dos polipéptidos que cuando se alinean óptimamente tiene un 85% de identidad de aminoácidos. La región variable de la cadena pesada y la cadena ligera se divide en segmentos que comprenden cuatro subregiones marco (FR1, FR2, FR3, y FR4), interrumpidas por tres tramos de secuencias hipervariables, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), como se define en la base de datos de Kabat (Kabat y col., ob. cit), con la CDR1 situada entre FR1 y FR2, la CDR2 entre FR2 y FR3 y la CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones concretas como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como se denomina por otros, representa las FR combinadas en la región variable de una única, única cadena de inmunoglobulina de origen natural. Tal como se usa en el presente documento, una FR representa una de las cuatro subregiones y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco. Las secuencias de las regiones marco de cadenas ligera o pesada diferentes están relativamente conservadas en una especie. La región marco de un anticuerpo son las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes y sirven para situar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de formar el sitio de unión de un anticuerpo que confiere especificidad y afinidad de unión a un epítipo de un antígeno. Comprendidas en las regiones variables de las cadenas H o L que proporcionan las regiones de unión a antígeno están secuencias más pequeñas denominadas "hipervariables" debido a su variabilidad extrema entre anticuerpos de diferente especificidad. Dichas regiones hipervariables se denominan también "regiones determinantes de la complementariedad" o regiones "CDR". Estas regiones CDR representan la especificidad básica del anticuerpo para una estructura determinante antigénica concreta. Las CDR representan tramos no contiguos de aminoácidos en las regiones variables, pero, con respecto a las especies, las localizaciones de las posiciones de estas secuencias de aminoácidos críticas comprendidas en las regiones variables de la cadena pesada y ligera se ha encontrado que tienen localizaciones similares en las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas pesada y ligera variables de todos los anticuerpos tienen cada una 3 regiones CDR, cada una no contigua con las otras (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3 para las cadenas ligera (L) y pesada (H) respectivas. Se han descrito las regiones CDR aceptadas por Kabat et al, 252 J. Biol. Chem. 6609-16 (1977), y se pueden identificar los bucles de las CDR aplicando estas reglas durante un examen de una secuencia de aminoácidos lineal. Las reglas para definir el bucle H3 de CDR pueden variar, sin embargo (véase el Capítulo 4, Antibody Engineering: Methods & Protocols, (Lo, ed. Humana Press, Totowa, NJ, 2004)), y los límites reales de algunos bucles H3 de CDR pueden no identificarse sin técnicas experimentales tales como difracción circular, resonancia magnética nuclear, o cristalografía de rayos X. En todas las especies de mamíferos, los péptidos de anticuerpos contienen regiones constantes (es decir, muy conservadas) y variables, y, comprendidas en la última, existen las CDR y las así denominadas "regiones marco" formadas por secuencias de aminoácidos comprendidas en la región variable de la cadena pesada o ligera, pero fuera de las CDR. Pueden definirse también las regiones de las CDR utilizando la nomenclatura de Chothia (CHOTHIA y LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) J Mol Biol. 20 de agosto de 1987:196(4):901-17). Por tanto, en determinadas realizaciones, las CDR son CDR definidas por Kabat, y en otras realizaciones, las CDR son CDR definidas por Chothia. Con respecto al determinante antigénico reconocido por las regiones CDR del anticuerpo, este se denomina también "epítipo" En otras palabras, el epítipo se refiere a aquella porción de cualquier molécula capaz de ser reconocida por, y unida por, un anticuerpo (la región de unión al anticuerpo correspondiente puede denominarse paratopo). En general, los epitopos consisten en agrupamientos de moléculas superficiales químicamente activos, por ejemplo, aminoácidos o cadenas secundarias de azúcares, y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb", como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clona. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma tales como las desveladas en HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988 y HAMMERLING, y col. Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas. Nueva York: Elsevier, 1981 págs.563-681.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variable y constante derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana que se corresponden estrechamente. El anticuerpo humano de la invención puede incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Por tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína es prácticamente similar a un anticuerpo de línea germinal humana. "Prácticamente similar" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 80, preferentemente 85, más preferentemente 90 e incluso más preferentemente 95% homóloga a la secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo de línea germinal humana.

Tal como se usa en el presente documento, el término "Fab" se refiere a regiones de moléculas de anticuerpos que incluyen la región variable de la cadena pesada y la cadena ligera y que presentan actividad de unión. "Fab" incluye agregados de una cadena pesada y una cadena ligera (conocidos comúnmente como Fab), si cualesquiera de los anteriores son agregados covalentes o no covalentes siempre que la agregación sea capaz de reaccionar selectivamente con un antígeno concreto o una familia de antígenos. El fragmento Fab es un heterodímero que comprende un dominio VL y un segundo polipéptido que comprende los dominios VH y CH1. En una realización preferida, el anticuerpo es un fragmento Fab'. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que el fragmento Fab' contiene unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la "región bisagra" del anticuerpo.

"F(ab')₂" se refiere a un fragmento obtenido mediante el tratamiento con pepsina de un anticuerpo o de la proteína equivalente obtenida mediante otras técnicas tales como tecnologías recombinantes. El fragmento F(ab')₂ tiene dos sitios de combinación a antígeno y es todavía capaz de reticular un antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación no covalente fuerte. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. En su conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, El scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno (LENNARD. Standard protocols for the construction of scFv libraries. Methods in molecular biology. 2002, n.º 178, págs.59-71).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene(n) la capacidad de unirse específicamente al CSF-1R.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden unirse a uno o más de un epítipo. Los diacuerpos se describen más completamente en POLJAK. Production and structure of diabodies. Structure. 1994, vol. 2, n.º 12, págs. 1121-3. HUDSON, y col. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. Journal of immunological methods. 1999, vol. 231, n.º 1-2, págs. 177-89 y KIPRIYANOV. Generation of bispecific and tandem diabodies. Methods in molecular biology. 2002, n.º 178, págs. 317-31.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos. No obstante, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Fab, Todos los fragmentos de anticuerpos, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Serán evidentes para el experto en la materia las técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. En otras realizaciones, en anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv).

Como se usa en el presente documento "Dominios de anticuerpos" (dAb) consiste en las unidades de unión funcionales más pequeñas de anticuerpos, correspondiendo a las regiones variables de cualquiera de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de los anticuerpo. Los dominios de anticuerpos tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o menos de un décimo del tamaño de un anticuerpo completo.

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

El término "anticuerpo" o "Ab" se refiere también a otro fragmento de anticuerpo bien conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en HOLLIGER, y col. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology, 2005, vol. 23, n.º 9, págs.1126-36 y HOOGENBOOM, y col. Natural and designer binding sites made by phage display technology. Immunology today. 2000, vol.21, n.º 8, págs. 371-8.

5 De acuerdo con una realización preferida, La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente a CSF-1R, más preferentemente CSF-1R humano, que comprende (a) una cadena pesada que consiste en la SEQ ID NO:37, y (b) una cadena ligera que consiste en la SEQ ID NO:39.

10 De acuerdo con otra realización preferida, La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente a CSF-1R, más preferentemente CSF-1R humano, que comprende (a) una cadena pesada que consiste en la SEQ ID NO:38, y (b) una cadena ligera que consiste en la SEQ ID NO:40.

De acuerdo con una realización ventajosa, La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente a CSF-1R, más preferentemente CSF-1R humano, que comprende (a) una cadena pesada que consiste en la SEQ ID NO:37, y (b) una cadena ligera que consiste en la SEQ ID NO:41.

15 De acuerdo con una realización, La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente a CSF-1R, más preferentemente CSF-1R humano, que comprende (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO 42 y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:44.

20 De acuerdo con otra realización, La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente a CSF-1R, más preferentemente CSF-1R humano, que comprende (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO 43 y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:45.

25 De acuerdo una realización adicional, La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente a CSF-1R, más preferentemente CSF-1R humano, que comprende (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO 42 y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:46.

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

30 En una realización relacionada, el anticuerpo humano comprende una región constante modificada o no modificada de una IgG 1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En una realización preferida, la región constante es de IgG1 o IgG4 humana, que puede opcionalmente modificarse para potenciar o disminuir determinadas propiedades.

35 en el caso de IgG 1, las modificaciones en la región constante, particularmente la bisagra o la región CH2, pueden aumentar o disminuir la función efectora, incluyendo la actividad ADCC y/o CDC. En otras realizaciones, una región constante de IgG2 está modificada para disminuir la formación de agregados anticuerpo-antígeno. En el caso de IgG4, las modificaciones en la región constante, particularmente la región bisagra, pueden reducir la formación de semianticuerpos.

40 La afinidad de unión deseada puede retenerse incluso aunque uno o más de los aminoácidos en el anticuerpo estén mutados. Estas variantes tienen al menos un aminoácido en el anticuerpo sustituido por un resto diferente. Se describe también un anticuerpo que se une específicamente a CSF1 como se ha descrito anteriormente en el que al menos uno de los aminoácidos comprendidos en la(s) CDR(s) está sustituido conservativamente. En la Tabla 3 se muestran las sustituciones conservativas.

Tabla 3

Aminoácido original	Sustitución conservativa preferida	Sustitución conservativa más preferida
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, D, K, R	Q
D	E, N	E
C	S, A	S
Q	N, E	N

(continuación)

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

Se desvela también un procedimiento para modificar el anticuerpo de la invención mediante maduración por afinidad.

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

Por tanto, se desvela también un anticuerpo, que se une específicamente a CSF-1R, obtenido mediante maduración por afinidad como se ha descrito anteriormente.

Se describen también variantes del anticuerpo previamente descritas, que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80%, preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, incluso más preferentemente 98% homóloga a la secuencia de ácido nucleico del anticuerpo anteriormente descrito.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se une específicamente a más de un epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede unirse a dos epítopos diferentes de CSF-1R. Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser capaz de unirse a CSF-1R y a otra molécula. Tal como se usa en el presente documento, los anticuerpos que se unen específicamente a más de un epítipo pueden ser anticuerpos reticulados. Por ejemplo, un anticuerpo puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. pueden prepararse anticuerpos reticulados utilizando cualesquiera procedimientos de reticulación convenientes bien conocidos en la materia. Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito por ejemplo en BRENNAN, y col. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*, 1985, vol. 229, n.º 4708, págs. 81-3 y SHALABY, y col. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *The Journal of experimental medicine*. 1992, vol. 175, n.º 1, págs. 217-25; KOSTELNY, y col. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. immunol*. 1992,

vol.148, n.º 5, págs. 1547-33.

De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo que se une específicamente a más de un epítopo de acuerdo con la invención es un diacuerpo.

5 De acuerdo con otra realización preferida, el anticuerpo que se une específicamente a más de un epítopo de acuerdo con la invención es un anticuerpo lineal como se describe en ZAPATA, y col. Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in Escherichia coli and enhanced antiproliferative activity. Protein engineering. 1995, vol. 8, n.º 10, págs. 1057-62.

10 En una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención se une específicamente a al menos un epítopo localizado entre las posiciones de aminoácidos 20 a 41 de la SEQ ID NO:29 (es decir, la parte del extremo N del dominio D1 humano). En una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención se une a un epítopo localizado entre las posiciones de aminoácidos 20 a 41 de la SEQ ID NO: 29 (es decir, la parte del extremo N del dominio D1 humano) y no se une a ningún epítopo localizado entre las posiciones de aminoácidos 42 a 90, y/o entre las posiciones de aminoácidos 91 a 104, y/o entre las posiciones de aminoácidos 105 a 199 y/o entre las posiciones de aminoácidos 200 a 298 de la SEQ ID NO: 29. De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención es capaz de reconocer el epítopo mínimo localizado entre las posiciones de aminoácidos 20 a 41 de la SEQ ID NO: 29 (es decir, la parte del extremo N del dominio D1 humano). De acuerdo con una realización ventajosa, el anticuerpo de la presente invención es capaz de reconocer y unirse a la construcción pTG18016 (véase la Figura 19 y el ejemplo relacionado).

20 En una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención no compite con el ligando de IL-34 por la unión al receptor de CSF-1R. La expresión "no compite con el ligando de IL-34", como se usa en el presente documento, se refiere a la falta de inhibición del ligando de IL34 con su receptor de unión a CSF-1R.

25 En una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención compite parcialmente con el ligando de CSF-1 por la unión al receptor de CSF-1R. La expresión "compite parcialmente con el ligando de CSF-1", como se usa en el presente documento, se refiere a una inhibición del ligando de CSF-1 con su receptor de unión a CSF-1R que es menor de 100%, preferentemente menor de 50% e incluso más preferentemente menor de 20% y, de forma ventajosa, menor de 10%. Este inhibidor parcial reduce de forma única, pero no excluye totalmente la unión al ligando, la inhibición se denomina inhibición parcial.

30 En una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención es capaz de inhibir parcialmente la unión de CSF1 a su receptor CSF-1R, y no es capaz de inhibir totalmente dicha unión. Más particularmente, los anticuerpos de acuerdo con la invención son capaces de disminuir la unión de CSF-1 a CSF-1R en aproximadamente 5 a 10%. De acuerdo con una realización especial, dicha disminución de la unión se mide como se describe en la presente sección experimental, midiendo la unión de CSF-1 (que tiene una secuencia de aminoácidos que se extiende desde la posición 1 a 444 de la SEQ ID: 47 - véase la figura 21) sobre el receptor de CSF-1R, que tiene una secuencia de aminoácidos que se extiende desde la posición 20 a la de Glu 512 de la SEQ ID NO:29.

35 En una realización preferida, los anticuerpos de acuerdo con la invención se caracterizan por una elevada afinidad de unión a CSF1-R. Más concretamente, los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen una Ki de menos de 1 nM, preferentemente menos de 0,8 nM, y más preferentemente menos de 0,6 nM. Como resultado de dicha inesperadamente elevada afinidad, los anticuerpos de la invención pueden administrarse en menor cantidad y por tanto se eliminan potenciales efectos secundarios.

40 En realizaciones particulares, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo antagonista, que bloquea o inhibe parcial o completamente la actividad de un polipéptido o célula a la cual se une específica o preferentemente, es decir, unas células que expresan CSF1-R, más preferentemente, unas células humanas que expresan CSF1-R, y, de forma ventajosa células de cáncer humano que expresan CSF1-R.

45 De acuerdo con una realización específica de la presente invención, el anticuerpo de la presente invención presenta al menos una de las siguientes propiedades:

- Ensayo In Vitro: el anticuerpo de acuerdo con la invención no compite con el ligando de IL-34 por la unión con el receptor de CSF-1R;
- Ensayo In Vitro: el anticuerpo de la invención compite parcialmente con el ligando de CSF-1 por la unión con el receptor de CSF-1R;
- 50 - Ensayo de ADCC: en presencia de células mononucleares de sangre periférica humana normal, el anticuerpo de la presente invención ejerce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) frente a células humanas que expresan CSF1-R, especialmente células de cáncer humano que expresan CSF1-R;
- Ensayo In Vivo: el anticuerpo de la presente invención ejerce efectos antitumorales frente a células de cáncer humano que expresan CSF1-R que transportan animales no humanos;

- Ensayo In Vivo: el anticuerpo de la presente invención ejerce efectos antitumorales frente a animales, incluyendo seres humanos, que transportan células de cáncer humano que expresan CSF1-R,
 - Ensayo In Vivo: el anticuerpo de la presente invención inhibe la proliferación de células AML5 dependiente de CSF-1.
- 5 - Ensayo In Vivo: el anticuerpo de la presente invención inhibe parcialmente la fosforilación de CSF-1R dependiente de CSF-1;
- Ensayo In Vivo: el anticuerpo de la presente invención no tiene actividad agonista sobre CSF-1R.

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

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "glicosilación" se refiere a la presencia de unidades de hidratos de carbono que están unidas covalentemente al anticuerpo.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se conjuga con un agente radiosensibilizante, un receptor y/o un agente citotóxico

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "radiosensibilizante" se refiere a una molécula que hace que las células sean más sensibles a la radioterapia. Los radiosensibilizantes incluyen, aunque no de forma limitativa, metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina (BUdR), 5-yododesoxiuridina (IUdR), bromodesoxicidina, fluorodesoxiuridina (FUdR), hidroxurea y cisplatino.

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

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión agente citotóxico se refiere a un compuesto que es directamente tóxico para las células, evitando su reproducción o crecimiento. De acuerdo con una realización preferida, el agente citotóxico usado en el contexto de la presente invención se selecciona entre el grupo que comprende un agente terapéutico contra el cáncer, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo.

25 En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se conjuga con un agente de marcado.

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

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "conjugado" significa que el anticuerpo de acuerdo con la invención y el agente de marcado se unen covalentemente o no covalentemente.

"Unión covalente" se refiere a un acoplamiento mediante grupos funcionales reactivos, opcionalmente con el uso intermediario de un reticulador u otro agente de activación (véase, por ejemplo, HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic Press 1996). El anticuerpo de acuerdo con la invención y/o el agente conjugado puede estar modificado a fin de permitir su acoplamiento mediante, por ejemplo, sustitución en un grupo carbonilo activado (incluyendo aquellos activados in situ) o en un imidoéster, mediante la adición en un grupo carbonilo insaturado, mediante aminación reductora, sustitución nucleófila en un átomo de carbono saturado o en un heteroátomo, mediante reacción en ciclos aromáticos, En particular, se puede llevar a cabo el acoplamiento utilizando reactivos de reticulación homobifuncionales o heterobifuncionales. Se pueden usar reticuladores homobifuncionales incluyendo glutaraldehído, ácido succínico y bis-imidoéster análogos a DMS (dimetil suberimidato) para acoplar grupos amino que pueden estar presentes en los diversos restos. Se proporcionan numerosos ejemplos en HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. págs. 118-228. que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los reticuladores heterobifuncionales incluyen aquellos que tienen grupos amina reactivos y grupos sulfhidrilo reactivos, los grupos carbonilo reactivos y los grupos sulfhidrilo reactivos y los grupos amina reactivos y grupos enlazadores fotorreactivos. Los reticuladores heterobifuncionales adecuados se describen, por ejemplo, en HERMANSON. Bio-conjugate techniques. Academic press, 1996 págs. 229-285, Los ejemplos son, por ejemplo, SPDP (propionato de N-succinimidil 3-(2-piridilditio)), SMBP (butirato de succinimidil-4-(p-maleimidofenilo)), SMPT (succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno), MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), SIAB (aminobenzoato de N-succinimidil (4 yodoacetil)), GMBS (éster de γ -maleimidobutiriloxi succinimida), SIAX (hexonato de succinimidil-6-yodoacetil amino), SIAC (succinimidil-4-yodoacetil aminometilo), NPIA (yodoacetato de p-nitrofenilo). Otros ejemplos son útiles para acoplar moléculas que contienen hidratos de carbono (por ejemplo, glicoproteínas env, anticuerpos) a grupos sulfhidrilo reactivos. Los ejemplos incluyen MPBH (hidrazida del ácido 4-(4-N maleimidofenil) butírico) y PDPH (4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxil-hidrazida (M2C2H y 3-2(2-pyridilditio) propionil hidrazida).

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

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

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

El vector puede ser de origen plásmido o vírico y puede, cuando es adecuado, combinarse con una o más sustancias que mejoran la eficacia de la transfección y/o la estabilidad del vector. Estas sustancias están ampliamente documentadas en la bibliografía que está disponible para la persona experta (véase, por ejemplo, FELGNER, y col. Cationic liposomes mediated transfection. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 1989, vol. 32, págs. 115-21 ; HODGSON, y col. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nature Biotechnology*. 1996, vol.14, n.º 3, págs. 339-42 ; REMY, y col. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjugate chemistry*. 1994, vol. 5, n.º 6, págs. 647-54). Por medio de una ilustración no limitante, las sustancias pueden ser polímeros, lípidos, en particular lípidos catiónicos, liposomas, proteínas nucleares o lípidos neutros. Estas sustancias se pueden usar solas o en combinación. Una combinación que se puede prever es la de un vector plásmido recombinante que se combina con lípidos catiónicos (DOGS, DC-CHOL, espermina-chol, espermidina-chol, etc.), lisofosfolípidos (por ejemplo, hexadecilfosfolina) y lípidos neutros (DOPE).

De acuerdo con una realización preferida, los lípidos catiónicos que se pueden usar en la presente invención son los lípidos catiónicos que se describen en el documento EP 901463 y, con más preferencia pcTG90.

La selección de los plásmidos que se pueden usar en el contexto de la presente invención es enorme. pueden ser vectores de clonación y/o vectores de expresión. De una manera general, son conocidos por las personas expertas y, aunque un gran número de ellos están comercialmente disponibles, es también posible construirlos o modificarlos utilizando las técnicas de manipulación genética. Los ejemplos que se pueden mencionar son los plásmidos que se derivan de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) o p Poli (LATHE, y col. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene*. 1987, vol. 57, n.º 2-3, págs. 193 (-201). Preferentemente, un plásmido que se usa en el contexto de la presente invención contiene un origen de replicación que asegura que la replicación se inicia en una célula productora y/o una célula hospedadora (por ejemplo, se seleccionará el origen colE1 para un plásmido que se prevé que se produzca en *E. coli* y se seleccionará el sistema oriP/EBNA1 si se desea que el plásmido deba autorreplicarse en una célula hospedadora de mamífero, LUPTON, y col. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and cellular biology*. 1985, vol. 5, n.º 10, págs. 2533-42; YATES, y col. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 1985, vol.313, n.º 6005, págs. 812-5). El plásmido puede comprender adicionalmente un gen de selección que permite seleccionar o identificar células transfectadas (complementación de una mutación auxotrofa, un gen que codifica resistencia a un antibiótico, etc.). Naturalmente, el plásmido puede contener elementos adicionales que mejoran su mantenimiento y/o su estabilidad en una célula dada (secuencia cer, que promueve el mantenimiento de un plásmido en forma monomérica (SUMMERS, y col. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*. 1984, vol. 36, n.º 4, págs. 1097-103, sequences for integration into the cell genome).

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

De acuerdo con una realización preferida, el vector vírico de acuerdo con la invención se deriva de un virus Vaccinia Ankara modificado (MVA). Los vectores MVA y los procedimientos para producir dichos vectores se describen completamente en las patentes europeas EP 83286 y EP 206920, así como en SUTTER, y col. Non replicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, vol. 89, n.º 22, págs. 10847-51. De acuerdo con una realización más preferida, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede insertarse en la delección I, II, III, IV, V y VI del vector MVA e incluso más preferentemente en la delección III (MEYER, y col. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. 1991, vol. 72, n.º Pt5, págs. 1031-8 ; SUTTER, y col. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. 1994, vol.12, n.º 11, págs. 1032-40).

Los retrovirus tienen la propiedad de infectar, y en la mayoría de los casos integrarse en, células en división, y a este respecto, son particularmente adecuadas para el uso en relación con el cáncer. Un retrovirus recombinante de acuerdo con la invención contiene generalmente las secuencias LTR, una región de encapsidación y la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención, que se coloca bajo el control de la LTR retroviral o de un promotor interno tal como los descritos a continuación. El retrovirus recombinante puede derivarse de un retrovirus de cualquier origen (murino, primate, felino, ser humano, etc.) y en particular del MoMuLV (virus Moloney de la leucemia de murino), MVS (virus de sarcoma murino) o retrovirus murino de Friend (Fb29). Se propaga en una línea celular de encapsidación que es capaz de suministrar en trans los polipéptidos víricos gag, pol y/o env que se requieren para constituir una partícula vírica. Dichas líneas de células se describen en la bibliografía (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc.). El vector retroviral de acuerdo con la invención puede contener modificaciones, en particular en las LTR (sustitución de la región promotora con un promotor eucariota) o la región de encapsidación (sustitución con una región de encapsidación heteróloga, por ejemplo, del tipo VL30) (véase documento US 5747323)

Se dará preferencia también a utilizar un vector adenoviral que carece de toda o parte de al menos una región que es esencial para la replicación y que se selecciona de las regiones E1, E2, E4 y L1-L5 para evitar que se propague el vector en el organismo hospedador o el entorno. Se prefiere una delección de la región E1. No obstante, puede combinarse con otra u otras modificación(es) diferentes que afectan, en particular, toda o parte de las regiones E2, E4 y/o L1-L5, en la extensión en la que las funciones esenciales defectivas se complementan en trans por medio de una línea de células de complementación y/o un virus auxiliar. A este respecto, es posible utilizar vectores de segunda generación del estado de la técnica (véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 94/28152 y WO 97/04119). A modo de ilustración, la delección de la mayor parte de la región E1 y de la unidad de transcripción E4 es muy particularmente ventajosa. A fin de aumentar las capacidades de clonación, el vector adenoviral puede carecer adicionalmente de toda o parte de la región E3 no esencial. de acuerdo con otra alternativa, es posible hacer uso de un vector adenoviral mínimo que retiene las secuencias que son esenciales para la encapsidación, concretamente las ITR 5' y 3' (Repetición terminal invertida), y la región de encapsidación. se conocen los diversos vectores adenovirales, y las técnicas para prepararlos, (véase, por ejemplo, GRAHAM, y col. *Methods in molecular biology*. Editado por MURREY. The human press inc, 1991 págs. 109-128).

Por otro lado, el origen del vector adenoviral de acuerdo con la invención puede variar desde el punto de vista de la especie y desde el punto de vista del serotipo. El vector puede derivarse del genoma de un adenovirus de origen humano o animal (canino, ave, bovino, murino, ovino, porcino, simio, etc.) o de un híbrido que comprende fragmentos de genoma adenoviral de al menos dos orígenes diferentes. Se puede hacer una mención más concreta de los adenovirus CAV-1 o CAV-2 de origen canino, de los adenovirus DAV de origen aviar o de los adenovirus Bad de tipo 3 de origen bovino (ZAKHARCHUK, y col. *Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA*. *Archives of virology*. 1993, vol. 128, n.º 1-2, págs. 171-6 ; SPIBEY, y col. *Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2*. *The Journal of general virology*. 1989, vol. 70, n.º Pt 1, págs. 165-72 ; JOUVENNE, y col. *Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes*. *Gene*. 1987, vol.60, n.º 1, págs. 21-8 ; MITTAL, y col. *Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector*. *The Journal of general virology*. 1995, vol. 76, n.º Pt 1, págs. 93-102). No obstante, se dará preferencia a un vector adenoviral de origen humano que se deriva preferentemente de un adenovirus de serotipo C, en particular, un adenovirus de serotipo C de tipo 2 o 5.

La expresión "competente para la replicación" como se usa en el presente documento se refiere a un vector vírico capaz de replicarse en una célula hospedadora en ausencia de cualquier complementación en trans.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el vector competente para la replicación es un vector adenoviral competente para la replicación. Estos vectores adenovirales competentes para la replicación son bien conocidos por un experto en la materia. Entre estos, los vectores adenovirales eliminados en la región E1b que codifica el inhibidor P53 de 55 kD, como en el virus ONYX-015 virus (BISCHOFF, y col. *An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells*. *Science*, 1996, vol. 274, n.º 5286, págs. 373-6 ; He HEISE, y col. *An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic antitumoral efficacy*. *Nature Medicine*. 2000, vol. 6, n.º 10, págs. 1134-9 ; documento WO 94/18992); son particularmente preferidos. Por consiguiente, este virus se puede usar para infectar y matar selectivamente las células neoplásicas deficientes en p53. Una persona normalmente experta en la materia puede también mutar y perturbar el gen inhibidor de p53 en el adenovirus 5 u otros virus de acuerdo con las técnicas establecidas. Se pueden usar en la presente invención los vectores adenovirales eliminados en la región de unión a E1A Rb. Por ejemplo, El virus Delta24 es un adenovirus mutante que transporta una delección en el par de bases 24 en la región E1A (FUEYO, y col. *A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo*. *Oncogene*. 2000, vol. 19, n.º 1, págs. 2-12). Delta 24 tiene una delección en la región de unión a Rb y no se une a Rb. Por tanto, la replicación del virus mutante está inhibida por Rb en una célula normal. No obstante, si Rb está inactivado y la célula se vuelve neoplásica, Delta 24 ya no está inhibido. En su lugar, el virus mutante se replica eficazmente y lisa la célula deficiente en Rb.

Se puede generar un vector adenoviral de acuerdo con la presente invención in vitro en *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante ligadura o recombinación homóloga (véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO 96/17070) o bien por recombinación en una línea de células de complementación.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el vector comprende además los elementos necesarios

para la expresión del anticuerpo de acuerdo con la invención.

Los elementos necesarios para la expresión consisten en todos los elementos que permiten transcribir la secuencia de ácido nucleico en el ARN y al ARNm traducirse en el polipéptido. Estos elementos comprenden, en particular, un promotor que puede ser regulable o constitutivo. Naturalmente, el promotor es adecuado para el vector seleccionado y la célula hospedadora. Los ejemplos que se pueden mencionar son los promotores eucariotas de la PGK (fosfoglicerato quinasa), MT (metalotioneína; **MCIVOR**. Purina nucleósido fosforilasa y adenosina desaminasa humanas: transferencia génica en células cultivadas y hemocitoblastos de murino utilizando retrovirus anfitriónicos recombinantes. *Molecular and cellular biology*. 1987, vol. 7, n.º 2, págs. 838-46), antitripsina a-1, CFTR, tensoactivo, inmunoglobulina, actina (TABIN, y col. Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology*. 1982, vol. 2, n.º 4, págs. 426-36 y SRA (TAKEBE, y col. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and cellular biology*. 1988, vol. 8, n.º 1, págs.466-72). Los genes, del promotor temprano del virus SV40 (virus de simio), de la LTR del VSR (virus del sarcoma de Rous), del promotor TK del HHS-I, del promotor temprano del virus CMV (Citomegalovirus), de los promotores p7.5K pH5R, de pK1 L, p28 y p11 del virus vaccinia, de promotores quiméricos tales como p11K7.5 y los promotores adenovíricos E1A y MLP. El promotor puede ser también un promotor que estimula la expresión en una célula tumoral o cancerosa. Se puede hacer mención particular de los promotores del gen MUC-I, que se expresan en exceso en los cánceres de mama y próstata (CHEN, y col. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. *The Journal of clinical investigation*. 1995, vol. 96, n.º 6, págs. 2775-82), del gen CEA (que significa antígeno de carcinoma embrionario), que se expresa en exceso en cánceres de colon (SCHREWE, y col. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and cellular biology*. 1990, vol. 10, n.º 6, págs 2738-48.) del gen de la tirosinasa, que se expresa en exceso en melanomas (VILE, y col. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer res*. 1993, vol. 53, n.º 17, págs. 3860-4), del gen ERBB-2, que se expresa en exceso en los cánceres de mama y de páncreas (HARRIS, y col. Gene therapy for cancer using tumor-specific prodrug activation. *Gene therapy*. 1994, vol. 1, n.º 3, págs.170-5.) y del gen de la α -fetoproteína, que se expresa en exceso en cánceres de hígado (KANAI, y col. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer res*. 1997, vol. 57, n.º 3, págs. 461-5). El promotor temprano del citomegalovirus (CMV) es muy particularmente preferido.

No obstante, cuando se usa un vector que se deriva de un virus Vaccinia (como por ejemplo, un vector MVA), el promotor del gen 7.5K de la timidina quinasa y el promotor pH5R son particularmente preferidos.

Los elementos necesarios pueden incluir además elementos adicionales que mejoran la expresión de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención o su mantenimiento en la célula hospedadora. Se pueden mencionar en concreto las secuencias intrónicas, las secuencias de señalización de la secreción, las secuencias de localización nuclear, los sitios internos para el reinicio de la traducción de tipo IRES, las secuencias poli A de terminación de la transcripción, los líderes tripartitos y los orígenes de la replicación. Estos elementos son conocidos por las personas expertas. Entre la secuencia de señalización de la secreción, son particularmente preferidas las secuencias que codifican los polipéptidos que se muestran en la SEQ ID NO 5 y/u 8.

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

La presente invención se refiere también a una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. En una realización preferida, la célula de acuerdo con la invención es una célula eucariota y más preferentemente una célula de mamífero. Las células de mamíferos disponibles como hospedadores para la expresión son bien conocidas en la materia e incluyen muchas líneas de células inmortalizadas, tales como, aunque no de forma limitativa, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK) y muchas otras. Las células eucariotas adicionales adecuadas incluyen levaduras y otros hongos.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención que comprende cultivar la célula de acuerdo con la invención en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo y la purificación del anticuerpo a partir de la célula o el medio que rodea la célula.

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

El vehículo farmacéuticamente aceptable es preferentemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y tiene una fuerza iónica relativamente baja, tal como por ejemplo, una solución de sacarosa. Por otra parte, tal como un vehículo puede contener cualquier disolvente, o líquido acuoso o parcialmente acuoso tal como agua estéril no pirógena. El pH de la composición farmacéutica se ajusta, además, y se tampona con el fin de cumplir los requerimientos del uso in vivo. La composición farmacéutica puede incluir también un diluyente, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable, así como agentes solubilizantes, estabilizantes y conservantes. Para la administración inyectable, se prefiere una formulación en una solución acuosa, no acuosa o isotónica. Esta puede proporcionarse en una única dosis o en una multidosis en forma líquida o seca (polvo, liofilizado y similar) que puede reconstituirse en el momento del uso con un diluyente adecuado.

Se desvela también un kit de una parte que comprende (i) una composición farmacéutica, un anticuerpo, una secuencia de ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención y, (ii) un compuesto de interés.

Como se usa en el presente documento, la expresión, "compuesto de interés" se refiere a un compuesto terapéutico y preferentemente a un agente terapéutico contra el cáncer o un compuesto útil en el tratamiento de disminución de la masa ósea.

El agente terapéutico contra el cáncer puede seleccionarse entre el grupo que comprende Abraxano (Formulación de nanopartículas estabilizada con paclitaxel albúmina), Adriamicina (Clorhidrato de doxorubicina), Aducril (Fluorouracilo), Aldara (Imiquimod), Alemtuzumab, Alimta (Pemetrexed disódico), Ácido aminolevulínico, Anastrozol, Aprepitant, Arimidex (Anastrozol), Aromasin (Exemestano), Arranon (Nelarabina), Trióxido de arsénico, Avastina (Bevacizumab), Azacitidina, Bevacizumab, Bexaroteno, Bortezomib, Campath (Alemtuzumab), Camptosar (Clorhidrato de irinotecan), Capecitabina, Carboplatino, Cetuximab, Cisplatino, Clafen (Ciclofosfamida), Clofarabina, Clofarex (Clofarabina), Clolar (Clofarabina), Ciclofosfamida, Citarabina, Citosar-U (Citarabina), Citoxan (Ciclofosfamida), Dacogen (Decitabina), Dasatinib, Decitabina, DepoCyt (Citarabina liposómica), DepoFoam (Citarabina liposómica), Clorhidrato de dexrazoxano, Docetaxel, Doxil (Liposomas de clorhidrato de doxorubicina), Clorhidrato de doxorubicina, Liposomas de clorhidrato de doxorubicina, Dox-SL (Liposomas de clorhidrato de doxorubicina), Efudex (Fluorouracilo), Ellence (clorhidrato de epirubicina), Eloxatin (Oxaliplatino), Emend (Aprepitant), Clorhidrato de epirubicina, Erbitux (Cetuximab), Clorhidrato de erlotinib, Evacet (Liposomas de clorhidrato de doxorubicina), Evista (Clorhidrato de raloxifeno), Exemestano, Faslodex (Fulvestrant), Femara (Letrozol), Fluoroplex (Fluorouracilo), Fluorouracilo, Fulvestrant, Gefitinib, Clorhidrato de gemcitabina, Gemtuzumab Ozogamicina, Gemzar (Clorhidrato de gemcitabina), Gleevec (Mesilato de imatinib), Herceptina (Trastuzumab), Hicamtin (Clorhidrato de topotecan), Mesilato de imatinib, Imiquimod, Iressa (Gefitinib), Clorhidrato de irinotecan, Ixabepilona, Ixempra (Ixabepilona), Keoxifeno (Clorhidrato de raloxifeno), Kepivance (Palifermina), Ditosilato de lapatinib, Lenalidomida, Letrozol, Levulan (Ácido aminolevulínico), LipoDox (Liposomas de clorhidrato de doxorubicina), Citarabina liposómica, Metazolastona (Temozolomida), Metotrexato, Milosar (Azacitidina), Milotarg (Gemtuzumab ozogamicina), Paclitaxel en forma de nanopartículas (Formulación de nanopartículas estabilizada con paclitaxel albúmina), Nelarabina, Neosar (Ciclofosfamida), Nexavar (Tosilato de sorafenib), Nilotinib, Nolvadex (Citrate de tamoxifeno), Oncaspar (Pegaspargasa), Oxaliplatino, Paclitaxel, Formulación de nanopartículas estabilizada con paclitaxel albúmina, Palifermina, Panitumumab, Paraplat (Carboplatino), Paraplatino (Carboplatino), Pegaspargasa, Pemetrexed disódico, Platinol-AQ (Cisplatino), Platinol (Cisplatino), Clorhidrato de raloxifeno, Revlimid (Lenalidomida), Rituxan (Rituximab), Rituximab, Aerosol intrapleural de esclerosol (Talco), Tosilato de sorafenib, Espricel (Dasatinib), Polvo de talco estéril (Talco), Esteritalco (Talco), Malato de sunitinib, Sutent (Malato de sunitinib), Sinovir (Talidomida), Talco, Citrate de tamoxifeno, Tarabina PFS (Citarabina), Tarceva (Clorhidrato de erlotinib), Targretina (Bexaroteno), Tassigna (Nilotinib), Taxol (Paclitaxel), Taxotere (Docetaxel), Temodar (Temozolomida), Temozolomida, Temeirolimus, Talomida (Talidomida), Talidomida, Totect (Clorhidrato de dexrazoxano), Clorhidrato de topotecan, Torisel (Temeirolimus), Trastuzumab, Trisenox (Trióxido de arsénico), Tikerb (Ditosilato de lapatinib), Vectibix (Panitumumab), Velcade (Bortezomib), Vidaza (Azacitidina), Vorinostat, Xeloda (Capecitabina), Zinecard (Clorhidrato de dexrazoxano), Ácido zoledrónico, Zolinza (Vorinostat) y Zometa (Ácido zoledrónico).

El compuesto útil en el tratamiento de la disminución de la masa ósea es un bifosfonato, unos moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERM), una hormona paratiroidea (PTH) (por ejemplo teriparatida (Forteo)), ranelato de estroncio, Denosumab o calcitonina, o una de sus combinaciones. El bifosfonato puede seleccionarse entre el grupo que comprende Alendronato (Fosamax, Fosamax Plus D), Etidronato (Didronel), Ibandronato (Boniva), Pamidronato (Aredia), Risedronato (Actonel, Actonel W/Calcio), Tiludronato (Skelid), y ácido zoledrónico (Reclast, Zometa). Los SERM pueden seleccionarse entre el grupo que comprende raloxifeno (Evista), bazedoxifeno/premarina (Aprelal) y tamoxifeno.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico, el vector, o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para el tratamiento de las enfermedades asociadas con una actividad aumentada de los osteoclastos. Dichas enfermedades comprenden, aunque no de forma limitativa, endocrinopatías (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, desnutrición), enfermedades crónicas (síndromes de mala absorción, insuficiencia renal crónica (osteodistrofia renal), enfermedad hepática crónica (osteodistrofia hepática), fármacos (glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), tratamiento de privación de andrógenos, tratamiento con inhibidores de la aromatasas, heparina,

alcohol), y enfermedades hereditarias (osteogénesis imperfecta, homocistinuria), osteoporosis, osteopetrosis, inflamación del hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Paget.

5 De acuerdo con otra realización, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para el tratamiento de las enfermedades asociadas con inflamación y/o autoinmunidad. Dichas enfermedades comprenden, aunque no de forma no limitativa, espondiloartropatía seronegativa (artritis psoriática, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, espondiloartropatía asociada con enfermedad inflamatoria del intestino), aflojamiento protésico de las articulaciones, enfermedades del tejido conectivo (artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso (SLE) y nefritis lúpica, escleroderma, síndrome de Sjogren, enfermedad del tejido conectivo mixto, polimiositis-dermatomiositis), enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa), enfermedad de Whipple, artritis asociada con ileocolitis granulomatosa, dolencias inflamatorias de la piel (penfigoide bulloso autoinmunitario, pénfigo vulgar autoinmunitario, eczema, dermatitis), enfermedad inflamatoria del pulmón (alveolitis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, asma, bronquitis, bronquiolitis obliterante), enfermedad renal inflamatoria (glomerulonefritis, rechazo de aloinjerto renal, inflamación tubular renal), aterosclerosis, vasculitis sistémica (arteritis temporal/arteritis de células gigantes, arteritis de takayasu, poliarteritis nodosa, enfermedad de Kawasaki, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg Strauss, poliangiitis microscópica, glomerulonefritis necrotizante, púrpura de Henoch Schonlein, vasculitis crioglobulinémica esencial y otras vasculitis de los vasos pequeños, enfermedad de Behcet), enfermedades de activación de macrófagos (síndrome de activación de macrófagos (MAS), enfermedad de calvicie de inicio en adultos, síndrome hemofagocítico), polimialgia reumática, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, Diabetes mellitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, esclerosis múltiple (EM), síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Addison, y/o fenómeno de Raynaud, síndrome de Goodpasture.

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

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere, aunque no de forma limitativa, a carcinoma, adenocarcinoma de células acínicas, carcinomas adrenocorticales, carcinoma de células alveolares, carcinoma anaplásico, carcinoma basaloide, carcinoma de células basales, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma renaladinal, carcinoma embrionario, carcinoma anometroide, carcinoma fibrolamolar de células hepáticas, carcinomas foliculares, carcinomas de células gigantes, carcinoma hepatocelular, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma leptomanigio, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma menigial, carcinoma mesometonérfico, carcinoma indiferenciado microcelular, carcinoma escamocelular, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de células transicionales, carcinoma de células tubulares,, sarcoma ameloblástico, sarcoma angiolítico, sarcoma botrioide, sarcoma de estroma endometrial, sarcoma de Ewing, sarcoma fascicular, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma inmunoblástico, sarcoma osteogénico yuxtacardial, sarcoma de Coppice, sarcoma leucocítico (leucemia), sarcoma linfático (linfosarcoma), sarcoma medular, sarcoma mieloides (sarcoma granulocítico), sarcoma austiogenci, sarcoma periosteal, sarcoma de células del retículo (linfoma histiocítico), sarcoma de células redondas, sarcoma de células fusiformes, sarcoma sinovial, sarcoma audiogénico telangiectático, linfoma de Burkitt, linfomas NPD, NML, NH y difuso. De acuerdo con una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención se dirige al tratamiento del cáncer metastásico a hueso, en el que el cáncer metastásico es de mama, pulmón, riñón, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, neoplasias malignas de células de la sangre, incluyendo leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, incluyendo cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de intestino, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer del conducto biliar o de vesícula biliar; neoplasias malignas del tracto genital de la mujer, incluyendo carcinoma de ovario, cánceres endometriales de útero, cáncer de vagina, y cáncer de cuello de útero; cáncer de vejiga; cáncer de cerebro, incluyendo neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, incluyendo melanoma maligno o cáncer escamocelular.

50 Se desvela también un procedimiento para mejorar el tratamiento de un paciente con cáncer que está experimentando tratamiento quimioterapéutico con un agente terapéutico contra el cáncer, que comprende el tratamiento simultáneo de dicho paciente junto con un procedimiento como se ha desvelado anteriormente.

Se desvela además un procedimiento para mejorar la eficacia citotóxica de fármacos citotóxicos o radioterapia que comprende tratar simultáneamente a un paciente que necesita dicho tratamiento junto con un procedimiento como se ha desvelado anteriormente.

55 La presente invención describe también un procedimiento para mejorar el tratamiento de un paciente con una enfermedad asociada a una actividad aumentada de los osteoclastos que es un tratamiento experimental con un bifosfonato, unos moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERM), una hormona paratiroidea (PTH) (por ejemplo teriparatida (Forteo)), ranelato de estroncio, Denosumab o calcitonina, o una de sus combinaciones, que comprende el tratamiento simultáneo de dicho paciente junto con un procedimiento como se ha desvelado anteriormente.

60

En otra realización, se contempla el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar el cáncer metastásico a hueso en un paciente que padece cáncer metastásico. En una realización relacionada, el cáncer metastásico es de mama, pulmón, riñón, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, neoplasias malignas de células de la sangre, incluyendo leucemia o linfoma; cánceres de cabeza o cuello; cánceres gastrointestinales, incluyendo cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de intestino, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer del conducto biliar o de vesícula biliar; neoplasias malignas del tracto genital de la mujer, incluyendo carcinoma de ovario, cánceres endometriales de útero, cáncer de vagina, o cáncer de cuello de útero; cáncer de vejiga; cáncer de cerebro, incluyendo neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; o cáncer de piel, incluyendo melanoma maligno o cáncer escamocelular.

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

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

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

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

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

La administración del anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico, el vector, o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido por el técnico experto. Las rutas de administración preferidas incluyen aunque no de forma limitativa la intradérmica, subcutánea, oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, ocular, vaginal, y rectal. De acuerdo con una realización preferida el anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico, el vector, o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administran sistémicamente.

La administración puede tener lugar en una única dosis o en una dosis repetida una o varias veces después de un determinado intervalo de tiempo. De forma deseable, el anticuerpo, la secuencia de ácido nucleico, el vector, o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administran 1 a 10 veces a intervalos semanales.

Para las directrices generales, la dosificación adecuada del anticuerpo es de aproximadamente 2 mg/kg a 30 mg/kg, 0,1 mg/kg a 30 mg/kg o 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. La dosificación adecuada del vector de acuerdo con la invención varía desde aproximadamente 10^4 a 10^{10} ufp (unidades formadoras de placas), de forma deseable entre aproximadamente 10^5 y 10^8 ufp para el vector MVA mientras que varía de aproximadamente 10^5 a 10^{13} ui (unidades infecciosas), de forma deseable entre aproximadamente 10^7 y 10^{12} ui para el vector basado en adenovirus. Se puede administrar una composición basada en plásmidos de vectores en dosis de entre 10 μ g y 20 mg, de forma ventajosa entre 100 μ g y 2 mg.

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

Breve descripción de las figuras en los dibujos

La Figura 1 representa la tinción específica de células NIH/3T3 transfectadas con CSF-1R por el mAb CXIIIG6.

La Figura 2 muestra la inhibición de la unión de CSF-1 al CSF-1R de la superficie celular en presencia del mAb CXIIIG6.

La Figura 3 muestra el bloqueo específico del CSF-1R humano soluble por el mAb CXIIIG6 ('ctrl' significa control; 'neg SN' significa control negativo del sobrenadante del hibridoma).

La Figura 4 muestra la inhibición de la diferenciación de osteoclastos humanos y la secreción de la metaloproteasa-9 de matriz (MMP-9) en presencia del mAb CXIIIG6 ('ctrl' significa control; 'CXIIIG6 SN' significa sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6; 'neg SN' significa control negativo del sobrenadante del hibridoma).

5 La Figura 5 muestra la reactividad no cruzada del mAb CXIIIG6 con otros receptores de la tirosina quinasa que tienen homología con CSF-1R ('SN' significa sobrenadante del hibridoma).

10 La Figura 6 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 2) de la cadena pesada de CXIIIG6. Las secuencias del cebador que incluyen los sitios de restricción para la clonación añadidos a las secuencias de nucleótidos están subrayadas. Los sitios de restricción se muestran en fuente cursiva subrayada. Las secuencias de aminoácidos de los dominios V están resaltadas en fuente negra.

15 La Figura 7 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 4) de la cadena ligera de CXIIIG6. Las secuencias del cebador que incluyen los sitios de restricción para la clonación añadidos a las secuencias de nucleótidos están subrayadas. Los sitios de restricción se muestran en fuente cursiva subrayada. Las secuencias de aminoácidos de los dominios V están resaltadas en fuente negra.

La Figura 8 muestra la construcción del plásmido pTG17753.

La Figura 9 muestra la construcción del plásmido pTG17727.

La Figura 10 muestra la construcción del plásmido pOptiVEC™.

La Figura 11 muestra la construcción del plásmido pTG17895.

20 La Figura 12 muestra la construcción del plásmido pTG17812.

La Figura 13 muestra la construcción del plásmido pTG17868.

La Figura 14 muestra la construcción del plásmido pTG17869.

La Figura 15 muestra las variantes de la cadena ligera CXIIIG6 humanizada.

La Figura 16 muestra las variantes de la cadena pesada de IgG1 de CXIIIG6.

25 La Figura 17 muestra el bloqueo específico del CSF-1R humano soluble por el CXIIIG6 recombinante de murino y la IgG1 de CXIIIG6 quimérica.

La Figura 18 muestra la inhibición de la diferenciación de los osteoclastos humanos y la secreción de la metaloproteasa-9 de matriz (MMP-9) en presencia de CXIIIG6 recombinante de murino e inG1 de CXIIIG6 quimérica.

30 La Figura 19 muestra las diferentes construcciones de CSF-1R utilizadas para cartografiar el epítipo de los anticuerpos monoclonales de la invención frente a aquellos anticuerpos dirigidos contra CSF-1R comercialmente disponibles. La secuencia humana se representa como una barra abierta y la secuencia de murino como una barra rellena. Los anticuerpos con sus nombres cruzados indican que no se unen a la construcción.

35 La Figura 20 muestra los límites de los dominios análogos a Ig de las diferentes construcciones de CSF-1R utilizadas para cartografiar el epítipo

Figura 21: Curva de competición entre el anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 y H27K15 no marcado sobre EL4-CSF-1R

Figura 22: Curva de competición entre el anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 y diversos anticuerpos sobre EL4-CSF-1R

Figura 23: Curvas de competición posteriores a la incubación: CSF-1/mAb

Figura 24: Curvas de competición previas a la incubación: mAb/ CSF-1

40 Figura 25: Curvas de competición simultáneas a la incubación: mAB + CSF-1

Figura 26: Curvas de competición simultáneas a la incubación: mAB + CSF-1R

Figura 27: Ausencia de reactividad cruzada de las variantes de mAb

45 Figura 28: Bloqueo de CSF-1R soluble. Las tres variantes de hCXIIIG6 y chCXIIIG6 bloquean CD115 humano soluble y restauran el crecimiento de las células M-NFS-60 dependiente de CSF-1. Los resultados se expresan como promedios +/- SEM de pocillos por cuadruplicado. Los valores ND50 se calcularon utilizando la ecuación logística de cinco parámetros GraphPadPrism.

Figuras 29:A/B/C/D: Inhibición de la proliferación de células AML3 dependiente de CSF-1. Para la Figura 29A, Se tiñeron células AML5 tanto con el mAN 3291 dirigido contra CD115 humano (panel izquierdo) como con chCXIIIG6 (panel derecho). Para cada panel, el histograma de la izquierda corresponde a células AML5 teñidas con los controles de isotipos (respectivamente IgG1 de ratón y rituximab). La Figura 29B muestra que el crecimiento de las células AML5 está estimulado por CSF-1 de una manera dependiente de la dosis. La Figura 29C muestra que las variantes de hCXIIIG6 y chCXIIIG6 inhiben la proliferación de las células AML5 dependiente de CSF-1, que muestra los resultados de tres experimentos independientes. La Figura 29D incluye los valores cuadrados de la CE50 y R, como se calculan mediante de software GraphPad Prism, a partir de los resultados que se muestran en la Figura 29C.

5
10
15

Figuras 30 A/B: Actividad de ADCC sobre las células EL4-CSF-R diana. En 30A, se utilizaron PBMC procedentes del donante de sangre n.º 1 como células efectoras para medir la actividad citotóxica de H27K5, H27K15 y H19K12 sobre las células EL4-CD115 diana a una relación E:T de 25. En 30B, se ensayaron PBMC procedentes del donante n.º 2 en el mismo ensayo que la Figura 30A en las relaciones E:T indicadas. Los asteriscos (*) indican $p < 0,05$ en comparación con rituximab, mientras que los símbolos theta (Φ) indican $p < 0,05$ en comparación con chCXIIIG6.

Figuras 31 A/B: Efecto terapéutico en el modelo de tumor BeWo de coriocarcinoma

Figura 32: Listado de secuencias SEQ ID NO: 37 a SEQ ID NO:47

Ejemplos

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

20 Se generó la línea de células B4-800-5 mediante transfección estable de células NIH/3T3 con un plásmido de expresión que codifica el CSF-1R humano de longitud completa. Se verificó la expresión de CSF-1R en la superficie de la célula sobre células B4-800-5 mediante inmunotinción indirecta con los mAb 61701 dirigidos contra CSF-1R humano IgG₁ de ratón, R&D Systems) o 2-4A5-4 (IgG_{1,k} de rata, GeneTex), en comparación con los controles de isotipos (Figura 1, paneles superior e intermedio). Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos del hibridoma de CXIIIG6 o de un hibridoma del control negativo para la inmunotinción de las células B4-800-5 o de las células NIH/3T3 precursoras (Figura 1 paneles inferiores).

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

Inhibición parcial de la unión de CSF-1 para el CSF-1R de la superficie celular

30 Se incubaron 3×10^5 células THP-1 (línea de células de leucemia monocítica positivas para CSF-1R humano) durante 30 min a 4°C en presencia de cualesquiera sobrenadantes del cultivo de hibridoma, suero de un ratón no expuesto anteriormente a tratamiento o de un ratón inmunizado contra CSF-1R (dilución 1:1000), el mAb 2-4A5-4 dirigido contra CSF-1R (GeneTex) o una IgG1 de rata del control (10 µg/ml), o sin reactivo. Después de dos lavados con PBS frío, se incubaron las células con 1 µg/ml de CSF-1 humano recombinante biotinilado durante 30 min. Se lavaron las células dos veces y se incubaron adicionalmente durante 30 min a 4°C con 10 µg/ml de estreptavidina-Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Tras el lavado con PBS y la fijación con paraformaldehído al 4%, se analizó la tinción de células mediante citometría de flujo.

35
40 Las intensidades de fluorescencia disminuidas en comparación con las muestras del control reflejan la inhibición de la unión de CSF-1 al CSF-1R de la superficie de la célula. El suero de un ratón inmunizado contra CSF-1R bloquea la unión de CSF-1 a las células TPH-1 (Figura 2). Mientras que el sobrenadante del hibridoma del control negativo o un mAb irrelevante no muestran efecto, El sobrenadante del cultivo del hibridoma de CXIIIG6 parece inhibir, al menos parcialmente, la unión de CSF-1 a células THP-1 (Figura 2, panel de la derecha inferior).

Primera localización del sitio de unión del mAb CXIIIG6.

45 Para identificar el sitio de unión del mAb CXIIIG6 en el CSF-1R, se llevó a cabo una transferencia Western utilizando formas solubles del CSF-1R que comprenden cualquiera de los cinco dominios extracelulares análogos a inmunoglobulina (Met 1 a Glu 512, R&D Systems) o únicamente los tres dominios análogos a inmunoglobulina en el extremo N de la región extracelular de CSF-1R (Met 1 a Ser 290), fusionados ambos en sus extremos C-terminales a la región Fc de una IgG₁ humana. Se usó una forma soluble del EGFR fusionado a una IgG₁ Fc humana (R&D Systems) como un control negativo.

50 Se sometieron cientos de nanogramos de cada receptor soluble a electroforesis en condiciones naturales antes de la transferencia a la lámina de nitrocelulosa y sondeando con cualesquiera sobrenadantes de hibridoma, pAb c-fms/CSF-1R H300 de conejo (Santa Cruz Biotechnology), mAb 61701 de ratón (R&D Systems) o suero de ratones no expuestos anteriormente a tratamiento o de ratones inmunizados contra CSF-1R.

Se detectaron ambas formas solubles del CSF-1R como bandas amplias cuando se sondearon con pAb c-fms/CSF-

1R H300, mAb 61701 o suero de los ratones inmunizados. No se observaron señales detectables con el suero de ratones no expuestos anteriormente a tratamiento o un sobrenadante de hibridoma del control negativo. El sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6 reconoció CSF-1R₁₋₂₉₀:Fc así como CSF-1R₁₋₅₁₂:Fc, pero no EGFR:Fc, indicando que CXIIIG6 se une específicamente a un epítipo que descansa sobre los tres dominios análogos a inmunoglobulina del extremo N (entre los restos 1 a 290) del CSF-1R humano.

Bloqueo específico del CSF-1R humano soluble por el mAb CXIIIG6

Se usó la línea de células M-NFS-60 (n.º CRL-1838, ATCC) de leucemia mieloide de murino dependiente de CSF-1 para evaluar la actividad bloqueante del sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6 en CSF-1R de humano y murino. Se preincubaron cinco nanogramos de CSF-1R humano (CSF-1R₁₋₅₁₂:Fc de R&D Systems) en microplacas con 96 pocillo blancos con diluciones en serie tanto de sobrenadantes de hibridoma, mAb 61701 (R&D Systems) o mAb del control de isotipo de murino. Se cultivaron durante la noche células 10E4 M-NFS-60 en ausencia de CSF-1, se añadieron a continuación en los pocillos del cultivo junto con 0,1 ng de CSF-1 humano en un volumen de ensayo final de 100 µl. Se incubaron los cultivos durante 48 h a 37°C y se cuantificó la proliferación mediante la incorporación de BrdU utilizando un ELISA de proliferación celular (Roche).

CSF-1R humano soluble inhibió completamente la proliferación de células M-NFS-60 mediada por CSF-1 humano, como se muestra en presencia de sobrenadante de hibridoma negativo que contiene una IgG₁ del control negativo o no (Figura 3; promedio +/- SEM de 3 pocillos). Por el contrario, el sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6 y el mAb 61701 del control positivo fueron capaces de restaurar la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis, mostrando que fueron capaces de neutralizar el CSF-1R humano soluble.

En este ensayo, la proliferación de células M-NFS-60 en presencia de diluciones bajas de sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6 mostró que el mAb CXIIIG6 fue incapaz de bloquear el CSF-1R de murino expresado por las células M-NFS-60. Por otra parte, en un ensayo de proliferación de M-NFS-60 soportado por CSF-1 de murino llevado a cabo en ausencia de CSF-1R soluble, el tratamiento con el mAb AFS98 dirigido contra CSF-1R de ratón (eBioscience) dio como resultado una drástica disminución del crecimiento celular dependiente de la concentración (no se muestran los datos). El sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6, los anticuerpos análogos del control negativo, y el sobrenadante del hibridoma negativo, no produjeron reducción en la proliferación celular. Estos resultados demuestran que el mAb CXIIIG6 se une específicamente al CSF-1R humano.

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

Se generaron osteoclastos a partir de monocitos humanos obtenidos mediante elutriación de PBMC a partir de un donante de sangre sano. En resumen, se sembraron monocitos a 2 x 10E4 por pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron durante 45 min tanto con sobrenadantes de cultivo de hibridoma, mAb 61701 dirigidos contra CSF-1R humano (R&D Systems) o 2-4A5-4 (GeneTex), mAb 26730 dirigido contra CSF-1 humano (R&D Systems), controles de isotipo de murino o rata, o sueros de ratones no expuestos anteriormente a tratamiento e inmunizados contra CSF-1R diluidos en medio de cultivo de hibridoma. Se añadió medio a-MEM completo a los pocillos del cultivo con o sin CSF-1 y RANKL (PeproTech, 25 y 40 ng/ml respectivamente). Los sobrenadantes de hibridoma, los mAb o/y el medio con o sin citoquinas se repusieron cada 3 días durante 9 días. Los sobrenadantes de cultivo acondicionados se recogieron en el día 9 y se evaluaron para la MMP-9 humana total utilizando un ensayo ELISA (R&D Systems). Se evaluó la formación de osteoclastos mediante la tinción de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) utilizando el kit de la fosfatasa ácida de leucocitos de Sigma-Aldrich.

CSF-1 + RANKL indujeron monocitos para diferenciarse en osteoclastos, definidos como grandes células multinucleadas positivas para TRAP, mientras que no se obtuvieron osteoclastos positivos para TRAP en ausencia de citoquinas. La adición de 0,5 µg/ml de mAb 26730 dirigido contra CSF-1 anuló la diferenciación de los osteoclastos, como se muestra por la ausencia de secreción de MMP-9. Los mAb 61701 o 2-4A5-4 dirigidos contra CSF-1R a la misma concentración, y el suero de ratón inmunizado (dilución 1:1000) inhibieron la formación de osteoclastos solo parcialmente (Figura 4; con (+) o sin (-) citoquinas; promedio +/- SEM de 3 pocillos; *: promedio de 2 pocillos). El tratamiento con sobrenadante del cultivo del hibridoma de CXIIIG6 diluido 1:20 o 1:100 redujo significativamente el nivel de producción de MMP-9, en comparación con los dos sobrenadantes de hibridoma del cultivo (A, B). Estos resultados demuestran que el mAb CXIIIG6 inhibe la diferenciación de los osteoclastos procedentes de monocitos humanos bloqueando la función del CSF-1R en la superficie de la célula.

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

Se utilizó la línea de células B4-800-5 mediante transfección estable de células NIH/3T3 con un plásmido que expresa CSF-1R humano para investigar el efecto del hibridoma de CXIIIG6 sobre la fosforilación de CSF-1R dependiente de CSF-1. Se sembraron las células a 2 x 10E5 células por placa Petri de 60 mm durante 48 a 72 h. Tras la privación de suero durante 1 h a 37°C, se trataron las células durante 1 h a 37°C con medio de cultivo que contenía tanto sobrenadante del hibridoma de CXIIIG6, mAb 2-4A5-4 (NeoMarkers) o los mAb del control del isotipo (diluidos en sobrenadante del hibridoma negativo), y a continuación se estimularon con 100 ng/ml de hCSF-1 o se dejaron sin estimular durante 5 min a 37°C. A continuación se lisaron las capas de células y se extrajeron las

proteínas totales. Se analizaron diez µg de proteínas sondando transferencias Western tanto con pAb c-fms/CSF-1R H300 de conejo como con pAb p-c-fms/CSF-1R (Tyr708)-R de conejo (Santa Cruz Biotechnology), seguido por anticuerpo de cabra dirigido contra inmunoglobulinas^{HRP} de conejo.

5 En ausencia de CSF-1, ni el sobrenadante del hibridoma de CXIIG6 ni la fosforilación del receptor inducida por el mAb 2-4A5-4 como se observa con el anticuerpo específico de CSF-1R fosforilado en la posición 708, mostraron que el mAb CXIIG6 no ejerce un efecto agonístico. Tras la estimulación con CSF-1, CSF-1R se fosforiló en Tyr708 y la cantidad de CSF-1R disminuyó en las células tratadas con el control del isotipo en comparación con las células sin estimular, lo que refleja la degradación del receptor (no se muestran los datos). El pretratamiento con el sobrenadante del hibridoma de CXIIG6 o con el mAb 2-4A5-4 no potencia la desaparición de CSF-1R. Se disminuyó la fosforilación de CSF-1R tras el tratamiento con el sobrenadante del hibridoma de CXIIG6 o con el mAb 2-4A5-4. Estos resultados muestran que el mAb de CXIIG6 es capaz de bloquear la fosforilación de CSF-1R dependiente de CSF-1.

Reactividad cruzada del mAb CXIIG6

15 Se ensayó la reactividad cruzada del mAb CXIIG6 mediante ELISA sobre una serie de receptores solubles purificados que pertenecen a la subfamilia de tipo III de los receptores de la tiroxina quinasa y que muestran homología con CSF-1R en sus dominios extracelulares análogos a Ig: VEGFR-1, VEGFR-2, Flt-3 y PDGFRβ solubles (expresados los cuatro como proteínas de fusión de Fc), así como se obtuvieron PDGFRα y SCFR (kit-c) de R&D Systems y se utilizaron para el revestimiento de una placa de ELISA. Se utilizó EGFR soluble (R&D Systems), de la subfamilia EGFR de receptores de la tiroxina quinasa, como un control negativo.

20 Los sobrenadantes del cultivo tanto de hibridoma CXIIG6 (CXIIG6 SN) como de hibridoma del control negativo, o la IgG₁ 61701 de ratón dirigida contra CSF-1R (R&D Systems) se incubaron sobre la placa ELISA revestida a las concentraciones de anticuerpo de 500 ng/ml. Tras el lavado de la placa ELISA, se desvelaron los anticuerpos unidos utilizando anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa (Sigma) y se midió la OD_(450-540nm). Los resultados representados en la Figura 5 muestran que los análogos del mAb 61701, unieron fuertemente CXIIG6 al CSF-1R mientras que no se detectó señal específica en cualquier otro receptor de la tiroxina quinasa. Esto muestra que entre los diversos receptores de tipo III de la tirosina quinasa ensayados, CXIIG6 es específico de CSF-1R.

Construcción de vectores de expresión del mAb CXIIG6

30 Se usó el OptiCHO™ Antibody Express Kit (Invitrogen, n.º de catálogo 12762-019) para la clonación de los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de CXIIG6 a fin de producir el mAb CXIIG6 en la línea de células de mamífero DG44. El OptiCHO™ Antibody Express Kit incluye: (1) El vector pOptiVEC™, un plásmido bicistrónico que permite la clonación del gen de interés corriente abajo del promotor del CMV. La transcripción del gen de interés se separó del marcador de selección auxotrofa de la dihidrofolato reductasa (DHFR) mediante un sitio de entrada al ribosoma (IRES), permitiendo la transcripción del gen de interés y del marcador de selección del mismo ARNm; (2) El vector pcDNA™3.3 que permite la clonación del gen de interés corriente abajo del promotor de CMV. El pcDNA™3.3 contiene un gen de resistencia a la neomicina que permite la selección usando Geneticin®. Los vectores pOptiVEC™ y pcDNA™3.3 contienen la secuencia TK poli-A de que dirige el procesamiento adecuado del extremo 3' del ARNm del gen de interés.

40 Se sintetizaron los cebadores específico (véase la Tabla 4) y se usaron para la amplificación de la PCR y la clonación de los genes de la cadena pesada y la cadena ligera de CXIIG6 completo (respectivamente SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3; véanse respectivamente la Figura 6 y la Figura 7). Los cebadores inversos incluyeron la secuencia consenso de Kozak para la traducción eucariótica eficaz (KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucleic Acids Res. 1987,15(20): 8125-8148.).

Tabla 4

Cebador	Secuencia
OTG18929	GCCGCCACCATGTA CT TGGGACTGAACTATGTATTC (SEQ ID NO :30)
OTG18930	GGAGATCTTCATTTACCCGGAGTCCGGGA (SEQ ID NO :31)
OTG18931	GCCGCCACCATGAGTGTGCCCACTCAGGTCCTG (SEQ ID NO :32)
OTG18932	GCCCGGGCTAACACTCATTCTGTTGAAGCTC (SEQ ID NO :33)

45 La cadena pesada de CXIIG6 se amplificó mediante la PCR utilizando OTG18929 y OTG18930 con el plásmido pTG17753 (Figura 8) como molde, y se clonó en el vector pOptiVEC™-TOPO® (pOptiVEC™-TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen, n.º de catálogo 12744-017-01) y los vectores pcDNA™3.3-TOPO® (pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen, n.º de catálogo K8300-01) para obtener respectivamente pTG17786 y pTG17789.

La cadena ligera de CXIIG6 se amplificó mediante la PCR utilizando OTG18931 y OTG18932 con el plásmido pTG17727 (Figure 9) como molde, y se clonó en el vector pOptiVEC™-TOPO® (pOptiVEC™-TOPO® TA Cloning®

Kit, Invitrogen, n.º de catálogo 12744-017-01) y los vectores pcDNA™3.3-TOPO® (pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning® Kit, Invitrogen, n.º de catálogo K8300-01) para obtener respectivamente pTG17788 y pTG17787.

La secuencia de nucleótidos del casete de expresión completa, incluyendo el promotor de CMV y la señal TK poliA de pTG17786, pTG17787, pTG17788 y pTG17789 se secuenciaron y se encontró que cumplían con sus secuencias teóricas.

Generación de anticuerpos quiméricos a partir del mAb CXIIIG6

Los dominios variables del mAb CXIIIG6 se combinaron con regiones constantes humanas.

Para generar la cadena ligera quimérica (denominada cadena Igk de CXIIIG6 quimérica), se diseñó una secuencia teórica uniendo la secuencia que codifica el dominio VK de CXIIIG6 (de la SEQ ID NO:3) con la secuencia que codifica la región IGKC humana (número de acceso del GenBank: J00241). Este fragmento de ADN *XbaI NotI* mantiene la misma secuencia no traducida en el extremo 5', incluyendo la secuencia de Kozak, como la utilizada en la versión de murino (como en pTG17787 y pTG17788 descritos anteriormente). La secuencia de la cadena ligera de CXIIIG6 quimérica se optimizó en el codón para la expresión en CHO, se ensambló a partir de oligonucleótidos sintéticos, y se subclonó en pOptiVEC™ (Figura 10) mediante *XbaI NotI* por GeneArt AG. La secuencia de ácido nucleico optimizada en el codón de la cadena ligera de CXIIIG6 quimérica obtenida (regiones variable y constante) es como se muestra en la SEQ ID NO:34. El plásmido obtenido se denominó pTG17895 (Figura 11).

Para generar las cadenas de IgG 1 e IgG4 pesadas quiméricas (denominadas respectivamente cadenas IgG1 de CXIIIG6 quimérica e IgG4 de CXIIIG6 quimérica), se diseñaron las secuencias uniendo la secuencia que codifica el dominio VH de CXIIIG6 (de la SEQ ID NO:1) con las secuencias que codifican tanto la región IGHG1C humana (número de acceso al GenBank: J00228) o para la región IGHG4C humana (número de acceso al GenBank: K01316). Estos fragmentos de ADN *XbaI NotI* mantienen la misma secuencia no traducida en el extremo 5', incluyendo la secuencia de Kozak, como la utilizada en la versión de murino (como en pTG17786 y pTG17789 como se ha descrito anteriormente). Las cadenas pesadas de CXIIIG6 quiméricas se optimizaron a continuación en el codón para la expresión en CHO, se sintetizaron y clonaron en pTG17812 (Figura 12) mediante *XbaI NotI* por GeneArt AG. La secuencia de ácido nucleico optimizada en el codón de la cadena pesada de IgG1 de CXIIIG6 quimérica obtenida (regiones variable y constante) es como se muestra en la SEQ ID NO:35 y los plásmidos obtenidos se denominaron pTG17868 (Figura 13). La secuencia de ácido nucleico optimizada en el codón de la cadena pesada de IgG4 de CXIIIG6 quimérica obtenida (regiones variable y constante) es como se muestra en la SEQ ID NO:36 y los plásmidos obtenidos se denominaron pTG17869 (Figura 14).

Generación de anticuerpos humanizados a partir del mAb CXIIIG6

Para generar las variantes de la cadena ligera humanizadas, se llevaron a cabo las sustituciones de acuerdo con la Tabla 2 en la región variable de la cadena ligera como se muestra en la SEQ ID NO:9.

Se diseñaron secuencias de ADN uniendo secuencias modificadas que soportan sustituciones del dominio VK de CXIIIG6 (de la SEQ ID NO:3) con la secuencia que codifica la región IGKC humana (número de acceso del GenBank: J00241). Este fragmento de ADN *XbaI NotI* mantiene la misma secuencia no traducida al extremo 5' que incluye la secuencia de Kozak como la utilizada en la versión de murino (como en pTG17787 y pTG17788 como se ha descrito anteriormente). Las secuencias de la cadena ligera de CXIIIG6 humanizada se optimizaron a continuación en el codón para la expresión en CHO, se ensamblaron a partir de oligonucleótidos sintéticos y se clonaron en pOptiVEC™ (Figura 10) mediante *XbaI NotI* por GeneArt AG. Las variantes y los plásmidos de la cadena ligera de CXIIIG6 humanizados obtenidos se relacionan en la Figura 15.

Para generar las variantes de la cadena pesada humanizadas, se llevaron a cabo sustituciones de aminoácidos de acuerdo con la Tabla 1 en las regiones variables de la cadena pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 6.

Se diseñaron secuencias de ADN uniendo las secuencias modificadas que soportan sustituciones del dominio VK de CXIIIG6 (de la SEQ ID NO:1) con las secuencias que codifican la región IGHG1C humana (número de acceso del GenBank: J00228). Los fragmentos de ADN *XbaI ApaI* mantienen la misma secuencia no traducida en el extremo 5' incluyendo la secuencia de Kozak como se utiliza en la versión de murino (como en pTG17786 y pTG 17789 como se ha descrito anteriormente). Las secuencias de ADN se optimizaron a continuación en el codón para la expresión en CHO, se sintetizaron y clonaron en pTG17812 (Figura 12) mediante *XbaI ApaI* por GeneArt AG. En la Figura 16 se relacionan las variantes y los plásmidos de la cadena pesada de IgG1 de CXIIIG6 humanizados obtenidos.

Actividades inhibitoras *in vitro* de CXIIIG6 de murino recombinante e IgG1 de CXIIIG6 quimérico

Para determinar si CXIIIG6 de murino recombinante purificado (como se ha descrito anteriormente) y su variante de IgG1 quimérica (IgG1 de CXIIIG6 quimérica, como se ha descrito anteriormente) fueron capaces de bloquear el CSF-1R humano soluble, se llevaron a cabo estudios de respuesta a la dosis en la proliferación de células M-NFS-60 y en los modelos de diferenciación de los osteoclastos (como se ha descrito anteriormente). IgG2a policlonal de murino purificado de Rockland (Rockland, 010-0141) e IgG1 quimérica producida por el solicitante se ensayaron en paralelo como anticuerpos del control. Se evaluó el efecto de bloqueo exponiendo las células a intervalos de concentración

de anticuerpos activos dirigidos contra CSF-1R, como se midió por la unión al antígeno en un ensayo del biosensor SPR. La comparación entre los mAb CXIIIG6 y su respectivo mAb de control se llevaron a cabo cargando cantidades iguales de anticuerpo total (ensayo del biosensor SPR mediante la unión a Fc).

5 Bioensayo de M-NFS-60: En el bioensayo de M-NFS-60, se trataron las células con 0,23 ng/ml a 0,5 µg/ml de mAb CXIIIG6 activos (CXIIIG6 de murino recombinante; IgG1 de CXIIIG6 quimérica) o las correspondientes concentraciones de mAb del control en presencia de 50 ng/ml de CSF-1R soluble humano y 1 ng/ml de CSF-1 humano durante 48 h. Los resultados representados en la [Figura 17](#) muestran que el crecimiento de células M-NFS-60 aumentó en respuesta a concentraciones crecientes de ambos mAb CXIIIG6 (CXIIIG6 de murino recombinante; IgG1 de CXIIIG6 quimérica) demostrando que antagonizaron la unión de CSF-1R soluble a CSF-1 (promedio +/- SEM de células por triplicado). La IgG1 de CXIIIG6 quimérica fue tan eficaz como CXIIIG6 de murino recombinante en la restauración de la proliferación celular. La IgG2a de murino del control y la IgG1 quimérica no tuvieron efecto sobre la neutralización de CSF-1 por CSF-1R soluble sobre su intervalo de concentración respectivo. Estos resultados muestran que CXIIIG6 de murino recombinante purificado e IgG1 de CXIIIG6 quimérica inhiben CSF-1R humano soluble.

15 Bioensayo de osteoclastos: En el bioensayo de osteoclastos, se incubaron monocitos humanos elutriados durante 8 días con 0,85 ng/ml a 0,62 µg/ml de mAb CXIIIG6 activos (CXIIIG6 de murino recombinante; IgG1 de CXIIIG6 quimérica) en presencia de 25 ng/ml de CSF-1 (ImmunoTools) y 40 ng/ml de RANKL. el medio y todos los agentes añadidos se repusieron en el día 4 y 6 y se midió la MMP-9 total en el medio de cultivo acondicionado desde el día 6 a 8. Los resultados representados en la [Figura 18](#) muestran que en comparación con los anticuerpos del control, CXIIIG6 de murino recombinante y su variante quimérica (IgG1 de CXIIIG6 quimérica) redujeron cada una significativamente la producción de MMP-9 que es paralela a la diferenciación de osteoclastos, indicando que se produjo un retardo en el crecimiento ([Figura 18](#); promedio +/- SEM de pocillos por triplicado).

Estos resultados demuestran además que CXIIIG6 de murino recombinante purificado e IgG1 de CXIIIG6 quimérica inhiben la función de CSF-1R en la superficie celular.

25 **Cartografía de epítomos del anticuerpo de la invención frente a anticuerpos comerciales**

Estos experimentos se han diseñado a fin de determinar la localización de los epítomos de los anticuerpos de la presente invención, y, determinar de forma más precisa si se unen a epítomos idénticos o diferentes de numerosos anticuerpos dirigidos contra CSF-1R comercialmente disponibles.

30 CXIIIG6 quimérico (chCXIIIG6) de la invención, mAb 3291 (IgG1 de murino, clon 61701, R&D Systems MAB3291) y mAb JF14 (IgG1 de murino, Santa Cruz sc-80174) se unen a CSF-1R humano pero no de murino. Se han seleccionado los anticuerpos monoclonales 3291 y JF14 tal como se han generado frente al resto del extremo N del CSF-1R humano. A fin de cartografiar los sitios de unión de mAb sobre CSF-1R, se construyeron los mutantes truncados de CSF-1R humano y las quimeras entre CSF-1R de D1-D3 de ser humano y murino fusionadas con etiquetas histidina (véanse las figuras 19 y 20 para los detalles). se expresaron estas construcciones como proteínas secretadas utilizando células CHO. Se comprobó la expresión de las construcciones mediante el análisis de la inmunotransferencia utilizando un anticuerpo dirigido contra la etiqueta His para la detección. Se capturaron todas las construcciones en placas ELISA incubando el sobrenadante del cultivo de células CHO en pocillos revestidos con un anticuerpo dirigido contra la etiqueta His. Se biotinilaron los anticuerpos utilizando Biotina-NHS (Sigma ref B3295-10MG). Se añadieron anticuerpos biotinilados a cada pocillo y se detectó la unión con estreptavidina-HRP. Se utilizó rituximab biotinilado (Du y col., 2007, J. Biol. Chem. 282 (20), 15073-15080, Números de registro NCBI 20SL_H & 20SL_L) como control de isotipo negativo (sin unión a CSF-1R). Se resumen los resultados en la [Figura 19](#).

45 *Resultados:* Como se esperaba, rituximab no se une a ninguna construcción ensayada. el CXIIIG6 quimérico, mAb 3291 y el mAb JF14 son capaces de unirse al dominio 1 aislado (D1) del CSF-1R humano (véase la construcción pTG18038; [Figura 19](#)). Por otro lado, la sustitución de D1 humano por D1 de murino eliminó completamente la unión de los tres mAb (véase la construcción pTG18003; [Figura 19](#)). Los resultados obtenidos utilizando las construcciones pTG18015 y pTG18000 combinando los subdominios humano y de murino D1 muestran que la unión de los mAb 3291 y JF14 requiere el extremo N y la parte central del dominio D1 de CSF-1R humano, mientras que la unión del anticuerpo monoclonal de la invención requiere solo la parte del extremo N del dominio D1 humano (véase la construcción pTG18016; [Figura 19](#)).

50 Estos datos muestran que el epítomo del anticuerpo monoclonal de la invención se une a CSF-1R humano en un epítomo diferente que los anticuerpos monoclonales 3291 y JF14. De forma interesante, las partes del extremo N de CSF-1R humano y de murino difieren solo en 4 restos: I20A, V27G, K33E y A36E (la metionina de inicio es el resto 1).

Anticuerpos monoclonales H19K12, H27K5 y H27K15

55 Se ha descrito anteriormente la generación del hibridoma CXIIIG6 que produce la IgG_{2a} de ratón con actividad bloqueante para la función de CSF-1R humano. Se clonaron y secuenciaron las cadenas pesada y ligera de la IgG_{2a} de CXIIIG6 (véanse las Figuras 6 y 7). Se construyó una versión quimérica del anticuerpo monoclonal (chCXIIIG6), combinando los dominios variables VH y VL del mAb CXIIIG6 con las regiones constantes de la IgG₁ humana (véase

anteriormente). Para aumentar la homología con las secuencias del anticuerpo humano y disminuir la inmunogenicidad potencial de los anticuerpos monoclonales, se generaron variantes humanizadas introduciendo mutaciones en los dominios VH y VL (véanse las Figuras 15 y 16).

5 262 versiones del anticuerpo monoclonal inmunizado de la invención se expresaron transitoriamente en células de ovario de hámster chino (CHO) y se ensayaron para su capacidad de unión a CSF-1R. Fuera de este primer cribado, treinta y una variantes de CXIIIG6 humanizado (hCXIIIG6) se seleccionaron sobre la base de (i) la afinidad con el CSF-1R humano, (ii) mayor homología con secuencias de la línea germinal humana (preferentemente dicha homología es al menos de un 76%, más preferentemente de al menos un 85% y (iii) menor inmunogenicidad realizada mediante simulación por ordenador. Los estudios de afinidad utilizando tecnología de microequilibrio de cristales de cuarzo (Attana) mostró que todas las variantes de hCXIIIG6 seleccionadas tenían afinidades similares para el CSF-1R humano recombinante, en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-10} M análogo al mAb chCXIIIG6 precursor. Se seleccionaron tres de 30 variantes humanizadas caracterizadas por la elevada afinidad con CSF-1R, mayor grado de homología humana y i menor inmunogenicidad realizada mediante simulación por ordenador para los estudios adicionales: H19K12, H27K5 y H27K15.

15 **Caracterización bioquímica del anticuerpo monoclonal H27K15 de la invención**

A- Radiomarcado del anticuerpo H27K15 con Yodo-¹²⁵

Materiales

Se proporcionó el anticuerpo monoclonal H27K15 de la invención como una solución acuosa (PBS pH 7,5) a una concentración de 2,1 mg/ml.

20 Se adquirió el radionucleido Yodo-¹²⁵ de Perkin Elmer como Yoduro de sodio en hidróxido de sodio 10^{-5} N (actividad específica: 643,8 GBq/mg - pureza del radionucleido: 99,95%).

Cloramina-T (N-cloro-p-toluenosulfonamida, PM: 227,6 g.mol⁻¹), se adquirieron metalbisulfito de sodio (PM=190,1 g.mol⁻¹), albúmina de suero de bovino (BSA) y ácido tricloroacético de Sigma.

Se preparó solución salina tamponada con fosfato 0,1 M, pH 7,2 en el laboratorio de los inventores.

25 *Procedimiento*

A 100 µg de anticuerpo, se añadieron 1,2 mCi de solución de Na¹²⁵I (44,4 MBq) y 7,6 µl de solución de cloramina T preparada de forma reciente (1 mg/ml en tampón fosfato). Después de 2 min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción añadiendo 12,7 µl de metabisulfito de sodio (1 mg/ml en tampón fosfato).

30 Se eliminó el Yodo-¹²⁵ no incorporado mediante filtración en gel en una columna Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia) previamente saturada con tampón de elución (tampón fosfato 0,1 M pH 7,2/ BSA al 0,5%). La columna se eluyó en 40 alícuotas de 0,5 ml. Se midió la radioactividad en cada fracción en un contador gamma automático calibrado para el radionucleido yodo-¹²⁵ (Contador gamma automático Wallace Wizard 2470 calibrado para el radionucleido yodo-¹²⁵ - Perkin Elmer) y se combinaron con las fracciones que contenían el producto radioyodado deseado.

35 Se estimó la pureza radioquímica del compuesto radiomarcado mediante el análisis ITLC llevado a cabo en placas de gel de sílice prerrevestidas de Gelman Sciences, utilizando TCA al 10% como eluyente.

Resultados y características de las soluciones de anticuerpos radiomarcados

Antes de la purificación, el rendimiento radioquímico como se determinó mediante ITLC fue del 97,8%.

Las características de la solución del anticuerpo radiomarcado se resumen a continuación:

	¹²⁵ I- H27K15
Peso molecular (Da)	150 000
Concentración en µg/ml	58,19
nM	387,93
Actividad específica (mCi/mg)	10,51
Relación Yodo/Anticuerpo	0,72
Actividad volúmica	612,57
Pureza radioquímica (%)	99,84

5 Se evaluaron la pureza y la integridad del anticuerpo radiomarcado mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS_PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. Se usó una amplia gama de patrones de peso molecular (Biorad Laboratories) consistente en 10 marcadores de peso molecular de 10 a 250 kDa para calibrar el gel. Se tiñeron los geles mediante azul de comassie. En una segunda etapa, se secaron los geles y se expusieron en una pantalla para autorradiografía utilizando PhosphorImager 445 SI (Amersham Biosciences). Se usó el software ImageJ (Molecular Dynamics) para el análisis de datos.

10 Los perfiles electroforéticos obtenidos tras la tinción del azul de comassie y la autorradiografía son idénticos. En condiciones no reductoras, se visualizó una banda principal a 150 kDa, que corresponde a la molécula de IgG completa. En condiciones reductoras, se detectaron bandas a 50 kDa y 25 kDa, que corresponden a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, respectivamente. Los resultados de estas electroforesis confirman que el procedimiento de la cloramina T no altera la integridad del anticuerpo.

B- Ensayos de unión del anticuerpo H27K15 radiomarcado sobre células EL4-CSF-1R

b1 Medición de la afinidad de unión de ¹²⁵I-H27K15

15 Se usó la constante de disociación del equilibrio (KD) como una medición de la afinidad de unión. Se determinó la KD para el anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 mediante un ensayo de saturación cuando se añadió una concentración creciente de anticuerpo radiomarcado a un número constante de células.

Materiales

Solución de anticuerpo radiomarcado en PBS que contiene BSA al 0,5%

	¹²⁵ I-H27K15
Actividad específica (mCi/mg)	10,51
Radiopureza (%)	99,84
Dilución en PBS que contiene BSA al 0,5%	Intervalo de concentraciones: diluciones en serie 2 veces de 4,5 µg/ml a 0,54 ng/ml (30 nM a 3,6 pM)

20 Soluciones de anticuerpo radiomarcado con un exceso molar de 100 veces de anticuerpo sin marcar (unión no específica): Se preparó una solución que contenía 45 µg/ml de anticuerpo sin marcar y 0,45 µg/ml de anticuerpo radiomarcado y a continuación se llevaron a cabo diluciones en serie 4 veces en PBS/BSA al 0,5%.

Células: Se preparó una suspensión de células EL4-CSF-1R a 40 x 10⁶ células/ml en PBS que contenía BSA al 0,5%.

Procedimiento

25 Se incubaron las células EL4-CSF-1R (2x10⁶ en 50 µl de PBS/BSA al 0,5%) con concentraciones crecientes de anticuerpo radiomarcado en un volumen final de 150µl durante 1 h en hielo con agitación.

Se determinó la unión no específica incubando simultáneamente un exceso de anticuerpo sin marcar (exceso molar de 100 veces).

30 Tras la incubación, las mezclas de reacción se superpusieron sobre 200 µl de un amortiguador de aceite de dibutilftalato y se centrifugaron en tubos de microfuga a 12000 rpm durante 3 min. Se congelaron los tubos en nitrógeno líquido y los extremos de los tubos que contenían los aglomerados celulares se cortaron para la determinación de la radioactividad utilizando un contador gamma automático Wallace Wizard 2470 calibrado para el radionucleido yodo-¹²⁵ (eficacia del 63%).

35 Se determinó la unión no específica midiendo la radioactividad unida e una concentración de cuatro puntos de anticuerpo radiomarcado que contenía un exceso molar de 100 veces de anticuerpo sin marcar. Se realizó un gráfico que traza la fracción unida frente a la fracción libre y se usó una regresión lineal a fin de definir la pendiente de la línea recta. Se definió la unión específica mediante la sustracción de la unión observada en presencia (unión no específica) de la observada en ausencia (unión total) de un exceso de anticuerpo sin marcar.

Resultados

40 Se determinaron la constante de afinidad del anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 humanizado para las células EL4-CSF-1R y los sitios de unión máxima por célula mediante el software Prism.

A continuación se resumen las características de unión del anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 para las células EL4-CSF-1R:

	¹²⁵ I-H27K15
Constante de disociación en nM en µg/ml	0,7161 ± 0,061 0,107 ± 0,009
B _{máx} en cpm	26422 ± 552
Número de sitios de unión por célula	3393 ± 71

b2 Medición de la constante de inhibición de H27K15 sin marcar

El objetivo de este estudio era determinar si la afinidad del anticuerpo radiomarcado inmunorreactivo es la misma que el anticuerpo sin marcar. Se llevó a cabo un ensayo de unión del desplazamiento radiomarcado con una concentración constante de anticuerpo radiomarcado y diluciones en serie de anticuerpo sin marcar.

5 **Material**

<i>Soluciones de anticuerpo radiomarcado en PBS que contiene BSA al 0,5%</i>	¹²⁵ I-H27K15
Actividad específica (mCi/mg)	10,51
Radiopureza (%)	99,84
Concentración	1,5 nM

Soluciones de anticuerpo sin marcar: Se preparó una solución a 450 nM (67,5 µg/ml) y a continuación se llevaron a cabo diluciones en serie 2,5 veces en PBS/BSA al 0,5%. Concentración del intervalo: 450 nM a 7,56 pM.

Células: Se preparó una suspensión de células EL4-CSF-1R a 40 x 10⁶ células/ml en PBS que contenía BSA al 0,5%.

10 **Procedimiento:** Se incubaron las células (2x10⁶ en 50 µl de PBS/BSA al 0,5%) con 50 µl de anticuerpo radiomarcado a 1,5 nM en ausencia (unión total: pocillo del control) y en presencia de concentraciones variables (anteriormente mencionadas) en 50 µl de anticuerpo sin marcar durante 1h en hielo con agitación.

15 Tras la incubación, las mezclas de reacción se superpusieron sobre 200 µl de un amortiguador de aceite de dibutilftalato y se centrifugaron en tubos de microfuga a 12000 rpm durante 3 min. Se congelaron los tubos en nitrógeno líquido y los extremos de los tubos que contenían los aglomerados celulares se cortaron para la determinación de la radioactividad utilizando un contador gamma.

Se calculó el porcentaje de unión relativa del anticuerpo radiomarcado como:

$$\frac{\text{Radioactividad en el pocillo del control}}{\text{Radioactividad en el pocillo de ensayo}} \times 100$$

20 (El pocillo del control es aquel sin presencia de anticuerpos sin marcar)

Resultados

En la Figura 21 se presentan los datos de la unión.

25 Se determinó el valor de la CI₅₀ obtenido de la curva de competición mediante el software Prism y se convirtió en una constante de inhibición absoluta Ki utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (Biochem. Pharmacol., 22, 3099-3108, 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + ([L]/K_D)}$$

[L] es la concentración de anticuerpo radiomarcado utilizada en el ensayo

CI₅₀ es la concentración de anticuerpo sin marcar necesaria para conseguir un 50% de inhibición

30 A continuación se resumen el valor de CI₅₀ y la inhibición constante:

	H27K15
CI50	0,856 ± 0,090
En nM	0,128, 0,013
En µg/ml	
Constante de inhibición	0,504 ± 0,053
En nM	0,076 ± 0,008
En µg/ml	

b3 Estudio de competición entre ¹²⁵I-H27K15 y diversos anticuerpos

Materiales

Solución de anticuerpo H27K15 radiomarcado en PBS que contiene BSA al 0,5%: Como anteriormente

5 Soluciones de anticuerpo sin marcar

Los diferentes anticuerpos se presentan en la tabla de la siguiente manera:

	H19K12	H27K5	chCXIIG6	3291	JF14	2-4A5
Concentración de la solución madre (mg/ml)	2,4	0,3	1	8,9 2	2	2

Para cada anticuerpo, se preparó una solución a 450 nM (67,5 µg/ml) y a continuación se llevaron a cabo diluciones en serie 2,5 veces en PBS/BSA al 0,5%. Concentración del intervalo: 450 nM a 7,56 pM.

10 *Células:* Se preparó una suspensión de células EL4-CSF-1R a 40 x 10⁶ células/ml en PBS que contenía BSA al 0,5%.

Procedimiento

Se incubaron las células (2x10⁶ en 50 µl de PBS/BSA al 0,5%) con 50 µl de anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 a 1,5 nM en ausencia (unión total: pocillo del control) y en presencia de concentraciones variables (anteriormente mencionadas en 50 µl de competidor sin marcar durante 1 h en hielo con agitación.

15 Tras la incubación, las mezclas de reacción se superpusieron sobre 200 µl de un amortiguador de aceite de dibutilftalato y se centrifugaron en tubos de microfuga a 12000 rpm durante 3 min. Se congelaron los tubos en nitrógeno líquido y los extremos de los tubos que contenían los aglomerados celulares se cortaron para la determinación de la radioactividad utilizando un contador gamma automático.

Se calculó el porcentaje de unión relativa del anticuerpo radiomarcado como:

20
$$\frac{\text{Radioactividad en el pocillo de ensayo} \times 100}{\text{Radioactividad en el pocillo del control}}$$

El pocillo del control es aquel sin presencia de competidor.

Resultados

En la Figura 22 se presentan los datos de la unión

25 Se determinó el valor de la CI₅₀ obtenido de la curva de competición mediante el software Prism y se convirtió en una constante de inhibición absoluta Ki utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + ([L]/K_D)}$$

30 [L] es la concentración de anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 utilizada en el ensayo
 CI₅₀ es la concentración de competidor necesaria para conseguir un 50% de inhibición del anticuerpo ¹²⁵I-H27K15
 K_D es la constante de afinidad del anticuerpo ¹²⁵I-H27K15.

Para cada competidor, a continuación se resumen los valores de CI₅₀ y Ki constantes:

	chCXIIIG6	H19K12	H27K5	3291	JF14	2-4A5
CI50 (nM)	1,483 ± 0,220	1,280 ± 0,246	0,998 ± 0,173	2,176 ± 0,281	3,025 ± 0,568	Sin competición
Ki (nM)	0,874 ± 0,130	0,754 ± 0,145	0,588 ± 0,102	1,281 ± 0,165	1,781 ± 0,334	

La afinidad de los anticuerpos monoclonales de la invención (H27K15, chCXIIIG6, H19K12 y H27K5) son muy similares, con un valor de Ki de 0,5 a 0,8 nM.

Los valores de Ki de los anticuerpos monoclonales comerciales 3291 y JF14 son mayores que 1 nM. Por consiguiente, estos anticuerpos tienen una afinidad más baja para el antígeno de CSF-1R que los anticuerpos monoclonales de la invención.

C - Ensayos de unión competitivos de CSF-1 humano a CSF-1R de D1-D5 humano

Se biotinilaron CSF-1(1-444) utilizando Biotina-NHS (Sigma referencia B3295-10MG). Se añadió CSF-1 biotinilado (100 µl/pocillo a 0,012 µg/ml) a los pocillos revestidos con CSF-1R de FC-D1-D5 humano (100 µl/pocillo a 1 µg/ml) (R&D systems referencia 329-MR-100) y se detectaron las moléculas unidas utilizando estreptavidina-HRP. Para los experimentos de competición, se preincubaron, incubaron simultáneamente o incubaron posteriormente cantidades crecientes de anticuerpos monoclonales (100 µl/pocillo a partir de 0,030 µg/ml a 200 µg/ml) con CSF-1 biotinilado.

Los inventores han ensayado el anticuerpo monoclonal comercial 3291 (R&D Systems referencia MAB3291), un H27K15 de la invención, un anticuerpo monoclonal X (documento WO2009/026303) como control positivo, ya que se sabe que compete con la unión de CSF-1 a su receptor, y rituximab como control negativo.

En caso de preincubación, los anticuerpos monoclonales se incubaron con CSF-1R humano revestido 1 hora antes de la adición del CSF-1 biotinilado.

En caso de incubación posterior, el CSF-1 biotinilado se incubó con CSF-1R humano revestido una hora antes de la adición de anticuerpos monoclonales.

En el caso de incubación simultánea, el CSF-1 biotinilado y los anticuerpos monoclonales se incubaron juntos con CSF-1R humano revestido.

Resultados: Se ha mostrado previamente (véase anteriormente) que los anticuerpos 3291 y H27K15 reconocen un epítipo (es decir: el dominio 1 análogo a Ig) que es diferente de aquel reconocido por el anticuerpo X del control positivo conocido por unirse al mismo sitio de unión que CSF-1 (es decir: en los dominios 2-3 análogos a Ig). En este caso, los inventores muestran que al contrario que el control positivo, los anticuerpos 3291 y H27K15 son competidores parciales de la unión de CSF-1, incluso a una elevada dosis de anticuerpo (es decir, ~100 veces la CI50). en todos los escenarios (preincubación, incubación simultánea o incubación posterior), y a dosis de saturación, H27K15 es capaz de disminuir la unión de CSF-1 a CSF-1R en aproximadamente 10 a 20% (véanse las Figuras 23, 24 y 25), mientras que el anticuerpo 3291 es capaz de disminuir la misma unión en aproximadamente 30 a 40% dependiendo del escenario experimental.

Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales de la presente invención son capaces de evitar parcialmente la unión de CSF1 con su receptor CSF-1R.

Esto se ha confirmado en el siguiente experimento.

Se revistieron microplacas ELISA con 0,1 µg (es decir, 100 µl a 1 µg/ml) de CSF1 1-444 humano (Geneart-véase la SEQ ID NO:47, Figura 32). 100 µl de CSF-1R de Fc-D1-D5 humano (R&D systems referencia 329-MR-100) a 0,125 µg/ml se incubaron simultáneamente en presencia de una concentración d una concentración creciente de anticuerpo. Se detectó CSF-1R de Fc-D1-D5 humano unido a CSF1 utilizando un HRP dirigido contra IgG-Fc humana (Bethyl A80-204P). debido a que el anticuerpo utilizado para la detección se une al Fc humano, se usó el anticuerpo CXIIIG6 de murino en vez del anticuerpo H27K15 para la competición. el mAb X competidor (documento WO2009/026303) se usó como control positivo ya que se sabe que se une al CSF-1R en el mismo sitio que CSF-1. Se usó la IgG2a de rata como control negativo (anticuerpo isotípico irrelevante que no se une a hCD115).

Resultados: el mAb X, como se indicó en el documento WO2009/026303, inhibe totalmente la unión de CSF1 (1-444) a CSF-1R de Fc-D1-D5 humano como esperaba para un anticuerpo competitivo. los anticuerpos 3291 y mCXIIIG6, disminuyen solo parcialmente la unión de CSF-1r de Fc-D1-D5 a CSF1 incluso a una dosis elevada de anticuerpo (es decir, 100 µg/ml). mCXIIIG6 y 3291 disminuyeron la unión de CSF1 a Fc-hCD115 en aproximadamente 5-10% y 10-20%, respectivamente (véase la figura 26). Estos resultados están de acuerdo con los descritos anteriormente que demuestran una inhibición parcial de la unión de CSF1 a CSF-1R de Fc-D1-D5 humano mediante H27K15 o el mAb 3291.

La Figura 26 muestra la disminución parcial de la unión de D1-D5 CD115 de Fc humano a CSF1 humano mediante varios mAb (experimento de incubación simultánea). CSF1 humano (0,1 µg/ml) se revistió en placas de 96 pocillo y

se incubó durante 1 h 45 min con una mezcla (experimento de incubación simultánea) de CSF-1R de Fc-D1-D5 humano recombinante (0,125 µg/ml) y concentraciones crecientes de mAb. El CD115 que se une a hCSF-1 se detectó utilizando una IgG dirigida contra Fc humano conjugada con HRP.

5 **D- Estudio de competición entre ¹²⁵I-H27K15 e IL-34, conocido como uno de los ligandos naturales del receptor CSF-1R.**

Materiales

Soluciones de anticuerpos radiomarcados en PBS que contienen BSA al 0,5% ¹²⁵I-H27K15 (como anteriormente)

10 *Soluciones de ligandos:* Se adquirió IL-34 humana recombinante (26,1 kDa) de R&D Systems a una concentración de 0,422 mg/ml. Se preparó una solución a 450 nM y a continuación se llevaron a cabo diluciones en serie 2,5 veces en PBS/BSA al 0,5%. Concentración del intervalo: 450 nM a 7,56 pM.

Células: Se preparó una suspensión de células EL4-CSF-1R a 40 x 10⁶ células/ml en PBS que contenía BSA al 0,5%.

Procedimiento

Se llevaron a cabo dos protocolos diferentes durante este estudio de competición con los ligandos naturales.

15 En el primero, se incubaron simultáneamente las células (2x10⁶ en 50 µl de PBS/BSA al 0,5%) con 50 µl de anticuerpo ¹²⁵I-H27K15 a 1,5 nM en ausencia (unión total: pocillo del control) y en presencia de concentraciones variables (anteriormente mencionadas) en 50 µl de competidor sin marcar durante 1 h en hielo con agitación.

20 El segundo protocolo era incubar células EL4-CSF-1R con concentraciones crecientes de ligando durante 30 min en hielo antes de la adición de anticuerpo H27K15 radiomarcado. Posteriormente, se llevó a cabo también la segunda incubación en hielo durante 1 hora con agitación.

Para los dos experimentos, las mezclas de reacción se superpusieron sobre 200 µl de un amortiguador de aceite de dibutilftalato y se centrifugaron en tubos de microfuga a 12000 rpm durante 3 min. Se congelaron los tubos en nitrógeno líquido y los extremos de los tubos que contenían los aglomerados celulares se cortaron para la determinación de la radioactividad utilizando un contador gamma.

25 Se calculó el porcentaje de unión relativa del anticuerpo radiomarcado como:

$$\frac{\text{Radioactividad en el pocillo de ensayo} \times 100}{\text{Radioactividad en el pocillo del control}}$$

(El pocillo del control es aquel sin presencia de ligando)

30 *Resultados:* No se observó desplazamiento de la unión del anticuerpo ¹²⁵I-H27K15. Por consiguiente, el anticuerpo H27K15 y el ligando IL-34 reconocen diferentes epítomos del antígeno de CSF-1R.

Por otra parte, se ha llevado a cabo el estudio de unión de la competición entre ¹²⁵I-IL-34 y el anticuerpo H27K15 humanizado que ha mostrado que la unión de ¹²⁵I-IL-34 no se desplazó con una concentración creciente del anticuerpo H27K15 que ilustrando en el presente documento que el anticuerpo de la invención no compite con IL-34 por la unión con el receptor CSF-1R.

35 **Caracterización biológica de las variantes H27K5, H27K15 y H19K12 de hCXIIIG6**

A, Expresión y purificación de anticuerpos monoclonales

CXIIIG6 quimérico, las variantes H19K12, H27K5, H27K15 de hCXIIIG6 y rituximab se expresaron tanto mediante transfección transitoria de células CHO-K1 o CHO-DG44 como mediante combinados policlonales de transfectantes CHO-DG44 estables.

40 **B. Especificidad de H27K5, H27K15 y H19K12 para CSF-1R entre otros receptores de la tirosina quinasa**

Procedimiento

45 Se revistieron placas de microvaloración (Maxisorp, Nunc) con 300 ng por pocillo de cada uno de los siguientes receptores solubles, adquiridos de R&D Systems: CSF-1R₂₀₋₅₁₂-Fc (n.º de catálogo 329-MR/CF), (EGFR)2-Fc-6xhis (n.º de catálogo 1129-ER), Flt-3-Fc-6xhis (n.º de catálogo 368-ST/CF), PDGFRβ-Fc-6xhis (n.º de catálogo 385-PR/CF), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)2-Fc-6xhis (n.º de catálogo 357-KD/CF), VEGFR1-Fc-6xhis (n.º de catálogo 321-FL-050), SCFR humano (n.º de catálogo 332-SR/CF) y PDGFRα ECDs (n.º de catálogo 322-PR/CF). Se añadieron cincuenta µl tanto de los mAb H27K5, H27K15, H19K12 o rituximab (500 ng/ml en PBS) a los pocillos y las placas se incubaron durante 1 h a 37°C. Para controlar un revestimiento eficaz de los pocillos, un anticuerpo dirigido contra IgG (anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana, Sigma n.º de

catálogo I3382) se incubó también con pocillos revestidos con el receptor de las proteínas Flt-3-Fc- de fusión a FC humano, PDGFR β -Fc, VEGFR2-Fc, VEGFR1-Fc, mientras que los pocillos revestidos con PDGFR α y SCFR se incubaron respectivamente con la inmunoglobulina dirigida contra PDGF-R α (IgG1 de ratón, R&D systems n.º de catálogo MAB322) e IgG de cabra dirigida contra SCF-R (R&D Systems n.º de catálogo AF332). Se detectó la unión del anticuerpo con Ab conjugados con peroxidasa de rábano picante dirigidos contra cualquier cadena ligera kappa de Ig humana (Bethyl Laboratories, n.º de catálogo A80-115P), IgG de cabra (Santa Cruz n.º de catálogo. sc2033) o Ig de ratón (Sigma n.º de catálogo A 0412', Tras el hallazgo con tetrametilbencidina (Sigma, n.º de catálogo T8665) (0,1 mg/ml en acetato de sodio 0,05 M, ácido cítrico 0,05 M, H₂O₂ 1/7000), se midió la absorbancia a 450 nm y se corrigió mediante la sustracción de la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro (Berthold, Tristar LB941).

Resultados

Al igual chCXIIIG6, ninguna de las variantes humanizadas mostró inmunorreactividad a cualquiera de los otros receptores ECD, aunque se unieron fuertemente a CSF-1R ECD inmovilizado (Figura 27). Este resultado muestra que la humanización no altera la especificidad de los mAb H19K12, H27K5 y H27K15 para CSF-1R entre otros receptores de la tirosina quinasa.

C. Actividad bloqueante de CSF-1R de las variantes hCXIIIG6

C.1 Bloqueo de CSF-1R-Fc soluble ensayado en el ensayo de proliferación de células M-NFS-60

Procedimiento

Las células M-NFS-60 se lavaron dos veces con medio RPMI-1640 completo sin CSF-1 y se incubaron durante la noche en el mismo medio para la privación de CSF-1. Para ensayar la neutralización de CSF-1R humano soluble, se incubaron 5 ng de CSF-1R20-512-Fc humano durante 30 min en microplacas de 96 pocillos blancos (ViewPlateTM-96, Packard) con diluciones en serie de anticuerpos (los mAb H27K5, H27K15, H19K12, chCXIIIG6 o rituximab en medio RPMI-1640 completo. a continuación se añadieron 104 células privadas de CSF-1 a los pocillos de cultivo junto con 0,1 ng de CSF-1 humano en un volumen de ensayo final de 100 μ l. Se incubaron las células durante 48 h a 37°C y se cuantificó la proliferación tras la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante 2 horas utilizando el ELISA de proliferación celular de Roche (n.º de catálogo n.º 11647223001) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se midieron las DO en un espectrofotómetro (Berthold Tristar LB941).

Resultados

La línea de células M-NFS-60 de leucemia mielógena de ratón es dependiente de CSF-1 para su crecimiento y se ha utilizado anteriormente para demostrar la actividad bloqueante de CSF-1R del mAb CXIIIG6 de murino. En este ensayo, Se cultivaron células M-NFS-60 con CSF-1 y CSF-1R20-512-Fc unido a disulfuro homodimérico soluble humano. La captura de CSF-1 por CSF-1R soluble conduce a la inhibición de la proliferación celular. La adición de anticuerpos que neutralizan CSF-1 R evita la captura de CSF-1 por CSF-1R soluble y restaura el crecimiento celular. En presencia del control negativo rituximab, CSF-1R soluble inhibió completamente la proliferación de células M-NFS-60 mediada por CSF-1 (Figura 28). H19K12, H27K5 y H27K15 produjeron una neutralización dependiente de la dosis de CSF-1 R20-512-Fc soluble y restauraron la proliferación celular, como lo hizo chCXIIIG6. Las DN50 (que proporcionan una dosis de neutralización del 50% del efecto bloqueante máximo de CSF-1R), calculadas con el software GraphPad Prism utilizando una ecuación logística de 5 parámetros, fueron similares para las 3 variantes de hCXIIIG6 ensayadas (29,8, 30,7 y 29,1 ng/ml respectivamente para H19K12, H27K5 y H27K15) y no parecen ser significativamente diferentes de la del mAb chCXIIIG6 (18,1 ng/ml).

C.2 Bloqueo de CSF-1R en la superficie de la célula ensayado en el ensayo basado en células AML5

Procedimientos

Inmunocitoquímica y análisis de citometría de flujo de células AML5

Se analizaron células AML5 (OCI-AML5, DSMZ n.º de catálogo ACC-247) mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo. Se incubaron 5 x 10⁵ células durante 30 min en hielo tanto con mAb 3291 dirigido contra CSF-1R humano (IgG1 de murino, clon 61701, 10 μ g/ml) (R&D Systems n.º de catálogo MAB3291), control del isotipo IgG1 de murino (R&D Systems n.º de catálogo MAB002, 10 μ g/ml), chCXIIIG6 (10 μ g/ml) como con rituximab en 100 μ l de PBS. A continuación se marcaron las células durante 30 a 45 min en hielo tanto con anticuerpo de cabra conjugado con ficoeritrina dirigido contra Ig de ratón (BD Pharmingen n.º de catálogo 550589) como F(ab')₂ conjugado con isotiocianato de fluoresceína dirigido contra IgG humana (Millipore n.º de catálogo AQ112F).

Efecto de CSF-1 sobre la proliferación de células AML5

Se sembraron en placas células AML5 a 2,5 E4 células / 100 μ l / pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano (en los experimentos 1 y 2 TPP b.º de catálogo 92096) o de fondo redondeado (en el experimento 3, Falcon n.º de catálogo 3077). Se añadieron cien μ l de medio que contenía CSF-1 humano por pocillo. Se cultivaron las células

5 durante 48 h y se midió su proliferación tras una incorporación de BrdU de 4 h, utilizando el ELISA de proliferación celular de Roche (n.º de catálogo 11647223001) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se midieron las DO en un espectrofotómetro (Berthold, Tristar LB941). Se calcularon los promedios de la DO +/- sem a partir de pocillos cuadruplicados y se representaron gráficamente frente al log [CSF-1] (ng/ml) utilizando GraphPad Prism para ajustar una curva de regresión no lineal utilizando una ecuación de 3 parámetros.

Efecto de las variantes de hCXIIIG6 sobre la proliferación de células AML5

10 Se cultivaron las células y se sembraron en placas de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente. Se añadieron cantidades graduadas de chCXIIIG6, H27K15, H27K5, H19K12 o rituximab del control negativo en 50 µl de medio. Tras una incubación durante 30 min a 37°C, se añadieron 50 µl de medio que contenía 40 ng/ml de hCSF-1 por pocillo. Se llevó a cabo cada experimento en 4 placas de 96 pocillos idénticas, comprendiendo cada una duplicados de cada concentración de mAb. Se cultivaron las células durante 48 h y se midió su proliferación tras una incorporación de BrdU de 4 h como anteriormente. Se analizó en primer lugar el resultado de cada placa utilizando GraphPad Prism para ajustar una curva de regresión no lineal con una ecuación de 5 parámetros. Se seleccionaron las placas que proporcionaban resultados ajustados por GraphPad Prism para al menos 3 de los 4 mAb ensayados para calcular el promedio +/- sem. Por tanto, se analizaron los experimentos 1 y 2 basándose en los resultados de 2 de las 4 placas (los promedios calculados a partir de valores DO cuadruplicados) y el experimento 3 basándose en los resultados de 3 de 4 placas (promedios calculados a partir de 6 valores de DO). Se calcularon los valores cuadrados de CE50 y R mediante GraphPad Prism para cada mAb ensayado.

Resultados

20 Se ha notificado que el factor 1 estimulador de colonias estimula el crecimiento de la línea de células OCI-AML5 (AML5) de leucemia mieloide aguda (Drexler HG, Zaborski M, Quentmeier H., 2007. Cytokine response profile of human myeloid factor-dependent leukaemia cell lines. *Leukemia* 11:701-8). Se analizaron células AML5 mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo. La tinción fue positiva con la IgG1 3291 de ratón dirigida contra hCSF-1R comercial (en comparación con el control del isotipo IgG1 de ratón) y con chCXIIIG6 (en comparación con rituximab), que muestra que las células AML5 expresaron CSF-1R en la superficie (Figura 29A).

30 A fin de configurar un modelo para estudiar el efecto del bloqueo de CSF-1R, Fue necesario en primer lugar verificar que CSF-1 indujo un aumento dependiente de la dosis en la proliferación de células AML5. La [Figura 29B](#) muestra que mientras las células AML5 son capaces de crecer en ausencia de CSF1 exógeno, la adición del factor de crecimiento en el medio de cultivo aumenta la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis. Las células AML5 no son por tanto estrictamente dependientes de CSF-1 para su crecimiento, pero son sensibles a CSF-1.

35 A continuación se ensayaron los efectos de las variantes de hCXIIIG6 y de chCXIIIG6 sobre las células AML5 cultivadas con 10 ng/ml de CSF-1, una concentración que induce casi la proliferación máxima (Figura 29B). La [Figura 29C](#) muestra los resultados de 3 experimentos independientes. Las variantes H27K5, H27K15 y H19K12 humanizadas, así como chCXIIIG6 indujeron una disminución dependiente de la dosis en la proliferación de células AML5. Se observó variabilidad entre los experimentos, reflejada por diferencias en la CE50 para cada mAb y los valores R cuadrados bastante bajos calculados utilizando GraphPad Prism, particularmente en el experimento 1 (Figura 29D). Por tanto, las variantes de hCXIIIG6 podrían no clasificarse de forma fiable de acuerdo con sus CE50 en este ensayo. Las 3 variantes de hCXIIIG6 parecieron ser igualmente potentes en la inhibición de la proliferación de células AML5 dependiente de CSF-1.

C.3 Efecto no agonístico sobre la señalización de CSF-1R y efecto inhibitor sobre la fosforilación dependiente de CSF-1

Procedimientos

45 B4-800-5 es una línea de células recombinante obtenida mediante transfección estable de células NIH/3T3 de murino con pTG17366, un plásmido de expresión que codifica CSF-1R humano. Se sembraron células B4-800-5 a 2×10^5 células por placa Petri de 60 mm y se cultivaron durante 72 h. Las células se privaron de suero en el cultivo en 1 ml de medio DMEM que contenía FCS al 1% a 37°C durante 1 h antes de los experimentos.

50 Para estudiar el bloqueo de CSF-1R o los efectos de los anticuerpos en ausencia de reticulación, se trataron las células con 1 ml de DMEM-FCS al 1% que contenía el mAb chCXIIIG6, H19K12, H27K5, H27K15 o rituximab del control del isotipo IgG1 humano durante 1 h a 37°C. Se añadieron 100 ng/ml de hCSF-1 (ImmunoTools n.º de catálogo. 11343115) al cultivo de células durante 5 min a 37°C o se dejaron las células sin estimular.

55 En el experimento de reticulación del anticuerpo, se trataron las células con 1 ml de DMEM-FCS al 1% que contenía el mAb chCXIIIG6, H19K12, H27K5, H27K15, rituximab del control del isotipo IgG₁ humano, IgG_{2a} CXIIIG6 de ratón recombinante o el control del isotipo IgG_{2a} de ratón (R&D Systems n.º de catálogo MAB003) durante 1 h en hielo. Se lavaron las células con PBS frío en hielo. se añadieron veinte µg/ml de anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IgG de ratón (R&D Systems n.º de catálogo AF007), Se añadieron 20 µg/ml de Fc^{HRP} policlonal de cabra dirigido contra IgG humano (Jackson n.º de catálogo 109-035-098) o 100 ng/ml de hCSF-1 a las células durante 10 min a

37°C o se dejaron las células sin tratar. Se retiró el medio y se lisaron las capas de células añadiendo tampón de extracción (Tris 62 mM, glicerol al 10 %, SDS al 2 %, DTT 100 mM, pH 6,8) en las placas Petri. Se analizaron los extractos celulares en transferencias Western, se sondaron con los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra fosfo-CSF-1R^{Tyr708} (Santa Cruz Biotechnology n.º de catálogo sc-33358-R), anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra CSF-1R (H300, Santa Cruz Biotechnology n.º de catálogo. sc-13949, dilución 1/200) y anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra β -actina (Sigma-Aldrich n.º de catálogo A2228, dilución 1/2000) para la detección de CSF-1R fosforilada con tirosina⁷⁰⁸, CSF-1R total y β -actina, respectivamente. Se detectaron anticuerpos primarios de conejo y ratón con anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra Ig^{HRP} de conejo o anticuerpo de conejo dirigido contra Ig^{HRP} de ratón (DakoCytomation n.º de catálogo. P0448, P0260) respectivamente.

Resultados

Los inventores investigaron los efectos de las variantes H19K12, H27K5 y H27K15 de hCXIIIG6 y de chCXIIIG6 sobre la fosforilación de la tirosina⁷⁰⁸ dependiente de CSF-1 y su ausencia de efecto agonístico. En ausencia de CSF-1, ningún mAb indujo la fosforilación del receptor cuando se ensayó tanto a 0,1, 1 o 10 μ g/ml, como se observa con el anticuerpo específico de CSF-1R fosforilado en la tirosina⁷⁰⁸. Esto mostró que todos los derivados de mAb CXIIIG6, tanto en formas quiméricas como humanizadas, no ejercen ningún efecto agonístico cuando se aplican solo sobre células B4-800-5

Tras la estimulación de CSF-1, una banda de ~150 kDa correspondiente al CSF-1R de longitud completa se fosforiló y el CSF-1R celular total se disminuyó en células cultivadas con el control del isotipo rituximab o sin anticuerpo. Se detectaron tres bandas diferentes de peso moleculares más bajos con el anticuerpo dirigido contra fosfo-CSF-1R^{Tyr708}. Cuando se incubaron células B4-800-5 a 37°C con variantes de chCXIIIG6 o hCXIIIG6 antes de la estimulación con CSF-1, las intensidades de las 4 bandas reconocidas por el mAb dirigido contra fosfo-CSF-1R^{Tyr708} se disminuyeron en comparación con las observadas en las células tratadas con rituximab. La reducción de la intensidad de la banda de 150 kDa fue comparable con la observada previamente con CXIIIG6 derivado de hibridoma en condiciones similares. La disminución en la intensidad de las dos bandas menores pareció más drástica. Los efectos inhibidores de las variantes de chCXIIIG6 y las variantes de hCXIIIG6 sobre la fosforilación de CSF-1R Tyr⁷⁰⁸ se observaron a 0,1 1 y 10 μ g/ml.

Para anticipar el desarrollo potencial de una respuesta humoral a hCXIIIG6 en pacientes tratados con mAb (respuesta en ser humano dirigida contra anticuerpo humano), los inventores investigaron a continuación el efecto de la reticulación del mAb mediante los Ab secundarios dirigidos contra IgG sobre la fosforilación del receptor CSF-1R. La reticulación del CXIIIG6 de ratón produjo solo una banda tenue de 150 kDa detectada con el anticuerpo dirigido contra fosfo-CSF-1R^{Tyr708} como se ha observado anteriormente con el CXIIIG6 derivado de hibridoma y fue detectable una ligera regulación por defecto del CSF-1R total, reflejando posiblemente una activación débil de CSF-1R. Tras la reticulación, las variantes de hCXIIIG6 y chCXIIIG6 produjeron también una banda de 150 kDa con una intensidad baja. La intensidad de la banda del CSF-1R fosforilado de 150 kDa fue extremadamente débil en comparación con la observada tras la estimulación con 100 ng/ml de CSF-1. Las bandas MW menores inducidas por CSF-1 no se detectaron por el anticuerpo dirigido contra CSF-1R^{Tyr708} tras la reticulación de cualquier derivado de mAb dirigido contra CSF-1R, tanto las variantes de chCXIIIG6 como de hCXIIIG6.

Estos experimentos de las variantes H19K12, H27K5 y H27K15 de hCXIIIG6, como chCXIIIG6, son capaces de inhibir parcialmente la fosforilación de CSF-1R dependiente de CSF-1 y no tienen actividad agonística directa sobre CSF-1R. La reticulación de los mAb sobre la superficie celular tiene solo un mínimo efecto sobre la fosforilación de CSF-1R.

D- Citotoxicidad de las células EL4-CSF-1R diana

Procedimiento

La línea de células EL4-CSF-1R recombinante se generó mediante transfección estable de la línea de linfocitos T EL4 derivada de linfoma (ATCC n.º de catálogo TIB 39) con un vector lentivírico que codifica el CSF-1R de longitud completa. Se verificó la expresión de CSF-1R en la superficie inmunotificando con mAb CXIIIG6 (IgG2a de ratón) o 3291 y el análisis de citometría de flujo (no se muestran los datos).

Se lavaron las células EL4-CSF-1R en medio DMEM completo, se volvieron a suspender en el mismo medio y se sembraron en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células por pocillo en 50 μ l. se opsonizaron las células durante 45-60 min en hielo con 50 μ l de anticuerpos diluidos en medio de cultivo. A continuación se añadieron 50 μ l en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a varias relaciones de efector a diana (E:T). Variantes de CXIIIG6 humanizadas, Se ensayaron chCXIIIG6 y el control negativo rituximab a 10 ng/ml, 0,3 y 10 μ g/ml. Los pocillos del control que contenían 150 μ l de medio de cultivo, células diana o PBMC solas se analizaron en paralelo para medir (i) el fondo del medio de cultivo (CM), (ii) el medio de cultivo + el fondo de solución de lisis, (iii) liberación espontánea de células diana (SR), (iv) liberación espontánea de células efectoras a cada concentración de PBMC y (v) liberación máxima de células diana (MR) en presencia de solución de lisis. Se centrifugaron las placas a 250 x g durante 4 min y se incubaron durante la noche a 37°C. El día siguiente, se añadieron 15 μ l de solución de lisis 10 X

(Promega n.º de catálogo G182A) para controlar pocillos que contenían medio de cultivo o células diana solas y se incubaron adicionalmente placas durante 45 min a 37°C. Se cuantificó la lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes del cultivo utilizando el Ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega n.º de catálogo. G1780) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se registró la absorbancia a 490 nm utilizando el lector TriStar LB 941 y el software MikroWin 2000 de Berthold Technologies.

Se sustrajo el fondo de CM promedio de los valores de SR diana y de SR efectoras experimentales. El fondo del CM promedio de la solución de lisis se sustrajo de los valores de MR diana. Se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando los valores de la DO, tras la sustracción de CM promedio y los controles de SR, con el software GraphPad Prism utilizando un test monolateral de Mann-Whitney no paramétrico (para comparar chCXIIG6 o cada variante de hCXIIG6 con rituximab) o un test de la t bilateral (para comparar cada variante de hCXIIG6 con chCXIIG6). Se calculó el porcentaje de lisis utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{\text{SR diana promedio experimental} - \text{SR efector promedio}}{\text{MR diana promedio} - \text{SR diana promedio}} \times 100$$

Resultados

Se ensayaron las actividades de ADCC de las variantes de chCXIIG6 y de hCXIIG6 (IgG₁ humana) en las células EL4-CSF-1R diana, utilizando PBMC de diferentes donantes de sangre.

Las células efectoras procedentes del donante n.º 1 se utilizaron a una relación E:T de 25:1 (Figura 30A). En este experimento, se observó aproximadamente un 10% de lisis directa en ausencia de mAb, que puede reflejar la actividad de linfocitos NK contenidos en las PBMC. Los valores obtenidos con el control negativo rituximab estuvieron en el mismo intervalo. Se ha verificado mediante análisis de citometría de flujo que las células EL4-CSF-1R no se unen a rituximab (no se muestran los datos). A 10 ng/ml de mAb, no se encontró lisis específica (por encima de la lisis no específica observada en presencia de rituximab) con los mAb dirigidos contra CSF-1R. A 0,3 µg/ml de mAb, chCXIIG6 indujo una citotoxicidad por encima del 20%. La lisis en las 3 variantes de hCXIIG6 estuvo en el mismo orden de magnitud. A altas concentraciones de mAb (10 µg/ml), las 3 variantes de hCXIIG6 produjeron cerca de un 35% de citotoxicidad, mientras que la lisis por chCXIIG6 permaneció por debajo del 20%.

Se llevó a cabo otro experimento utilizando células efectoras del donante n.º 2 a relaciones E:T de 25:1, 50:1 o 100:1 (Figura 30B). No se detectó la lisis directa, en contraste con el primer experimento. La citotoxicidad de fondo fue inferior al 10% con rituximab a todas las relaciones E:T ensayadas. Los resultados estuvieron en buena correlación con aquellos del experimento anterior: no se observó lisis específica a bajas concentraciones de mAb (10 ng/ml) sino a 0,3 y 10 µg/ml, chCXIIG6 y las 3 variantes de hCXIIG6 indujeron una lisis específica significativa de las células EL4-CSF-1R. A ambas de estas concentraciones de mAb y todas las relaciones E:T ensayadas, la lisis de las células diana fue de nuevo mayor con H27K5, H27K15 y H19K12 que con chCXIIG6 (p=0,02).

Estos resultados demuestran que chCXIIG6 y las variantes de hCXIIG6 tienen el potencial de destruir las células diana que expresan CSF-1R en la superficie.

El efecto terapéutico de los mAb quiméricos y humanizados dirigidos contra CSF-1R en el modelo de tumor BeWo

Debido a que las variantes chCXIIG6 y hCXIIG6 son específicas para el CSF-1R humano y no reconocen su homólogo de murino, sus efectos in vivo pueden solo investigarse en modelos de ratón utilizando tumores positivos para CSF-1R humanos. No obstante, en ausencia de CSF-1 humano, el CSF-1R humano permanece inactivo y no se puede estudiar el bloqueo de su función. Por otra parte, el bloqueo de células hospedadoras positivas para CSF-1R (macrófagos asociados a tumor, osteoclastos), que se espera que proporcione beneficio terapéutico, no es factible en este sistema de modelo. En los siguientes experimentos que utilizan tumores BeWo positivos para CSF-1R humano, solo los efectos citotóxicos de los mAb sobre las células tumorales pueden dar como resultado una eficacia terapéuticos.

Las células de coriocarcinoma BeWo humano expresan CSF 1R en la superficie

Las células BeWo cultivadas *in vitro* se inmunotñieron con el mAb H27K15 (que conduce al anticuerpo humanizado dirigido contra CSF-1R) y se analizó la fluorescencia mediante microscopía confocal. La tinción específica observada con H27K15, en comparación con el control negativo rituximab, muestra que las células BeWo expresan CSF-1R humano sobre su superficie. Las células BeWo no secretan CSF-1, como se encuentra mediante la valoración ELISA de los sobrenadantes del cultivo (no se muestran los resultados).

Un tumor sólido derivado de células Bewo implantado subcutáneamente en ratones alotímicos NMR1 se incluyó en OCT para el análisis por inmunohistoquímica. Las secciones de tejido congelado se tiñeron con la versión de CXIIG6 de murino o un control del isotipo. Se observó una fuerte tinción específica a lo largo del tumor, reflejando la superficie de la célula y la expresión citoplásmica de hCSF-1R en células de tumor Bewo *in vivo*.

Experimento 1: Efecto terapéutico de CXIIIG6 quimérico en el modelo de tumor BeWo de coriocarcinoma

5 Se implantaron cuatro millones de células BeWo por vía subcutánea en los flancos de ratones alotímicos NMR1. Se trató un grupo de 11 ratones con 3 inyecciones de CXIIIG6 quimérico (chCXIIIG6, 50 mg/kg en PBS, IP, administradas en los días 1, 3 y 7) mientras que otro grupo de 11 ratones se trató con el control de isotipo rituximab basándose en el mismo esquema. Se observaron la inhibición del crecimiento tumoral (Figura 31A) y la prolongación de la supervivencia del ratón (Figura 31 B) en los ratones tratados con chCXIIIG6, que muestran que el direccionamiento a los tumores beWo positivos para CSF-1R humano con este mAb tiene un efecto terapéutico.

Experimento 2: Efecto terapéutico de CXIIIG6 quimérico y H27k15 humanizado en el modelo de tumor BeWo de coriocarcinoma

10 Se repitió el anterior protocolo, con 2 modificaciones:

- se ensayaron los mAb chCXIIIG6 o H27K15 humanizado (10 ratones/grupo) y se compararon con el control del isotipo rituximab
- los mAb se inyectaron 3 veces a la semana durante 3 semanas, en vez de solo una semana de prolongación del tratamiento con chCXIIIG6 o con H27K15 que no mejora los resultados en términos de inhibición del crecimiento del tumor o supervivencia del ratón, en comparación con el primer experimento. No obstante, ambos mAb inhibieron el crecimiento tumoral en comparación con el grupo control del isotipo rituximab. En el caso de H27K15, la reducción en los volúmenes tumorales fue estadísticamente significativa en el día 14 utilizando el test de Mann-Whitney y cercana a la significativa en los últimos puntos temporales (día 17 y 21). Con chCXIIIG6, la reducción en los volúmenes tumorales fue cercana a la estadísticamente significativa.

20 **Referencias**

- WO 01/30381
- WO 03/059395
- WO 2005/068503
- EP 1488792 A
- 25 • US 2005059113
- EP 901463 B
- EP 83286 A
- EP 206920 A
- US 5747323
- 30 • WO 94/28152
- WO 97/04119
- WO 94/18992
- WO 96/17070
- WO2009/026303
- 35 • SHERR. Colony-stimulating factor-1 receptor. blood. 1990, vol. 75, n.º 1, págs.1-12.
- HUME, y col. Regulation of CSF-1 receptor expression. Molecular reproduction and development. 1997, vol. 46, n.º 1, págs.46-52.
- Roussel y SHERR, 1989, PNAS, 86, 7924-7927
- ASHMUN y col., 1989, Blood, 73, 827-837
- 40 • KLUGER, y col. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. Clinical Cancer research, 2004, vol.10, n.º 1, págs. 173-7.
- SCHOLL, y col. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. Journal of the National Cancer Institute. 1994, vol. 86, n.º 2, págs. 120-6.
- 45

- CHAMBERS, y col. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clinical Cancer Research*. 1997, vol. 3, n.º 6, págs. 999-1007.
- 5 • BAÍOCCHI, y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. *Cancer*. 1991, vol. 67, n.º 4, págs. 990-6.
- KIRMA, y col. Elevated expression of the oncogene c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing c-fms expression. *Cancer res.* 2007, vol. 67, n.º 5, págs. 1918-26.
- 10 • HEMMERLEIN, y col. Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, c-fms, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2000, vol. 49, n.º 9, págs. 485-92.
- IDE, y col. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, vol. 99, n.º 22, págs. 14404-9.
- 15 • RAMBALDI, y col. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1988, vol. 81, n.º 4, págs. 1030-5.
- SCHOLL, y col. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol. 86, n.º 2, págs. 120-6.
- 20 • TANG, y col. M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumor cells: M-CSF mediated recruitment of tumor infiltrating monocytes?. *Journal of cellular biochemistry*. 1992, vol. 50, n.º 4, págs. 350-6.
- SCHOLL, y col. Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer*. 1994, vol. 69, n.º 2, págs. 342-6.
- 25 • SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment*. 1996, vol. 39, n.º 3, págs. 275-83.
- DORSCH, y col. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol. 23, n.º 1, págs. 186-90.
- WANG, y col. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology*. 1988, vol.141, n.º 2, págs. 575-9.
- 30 • FILDERMAN, y col. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer res.* 1992, vol. 52, n.º 13, págs. 3661-6.
- DORSCH, y col. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol. 23, n.º 1, págs. 186-90.
- 35 • SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment*. 1996, vol. 39, n.º 3, págs. 275-83.
- BARON, y col. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *Journal of cell science*. 2001, vol. 114, n.º pt5, págs. 999-1010.
- 40 • CECCHINI, y col. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol. 46, n.º 1, págs. 75-83.
- BRUZZANITI, y col. Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine*. 2006, vol. 7, n.º 1-2, págs. 123-39.
- CICEK, y col. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer metastasis reviews*. 2006, vol. 25, n.º 4, págs. 635-44,
- 45 • KITAURA, y col. The journal of clinical investigation. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. 2005, vol. 115, n.º 12, págs. 3418-27.
- MARSHALL, y col. Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-I) leads to inhibition of DSS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2007, vol. 13, n.º 2, págs. 219-24.
- JOSE, y col. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and

- accumulation in renal allograft rejection. American journal of transplantation. 2003, vol. 3, n.º 3, págs. 294-300.
- KUTZA, y col. Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages. Journal of immunology. 2000, n.º 164, págs. 4955-4960.
 - 5 • SMITH, y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, n.º 147, págs. 195-7.
 - HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2ª edición, Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988.
 - HAMMERLING, y col. Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas. Nueva York: Elsevier, 1981 págs.563-681.
 - 10 • SMITH, y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, n.º 147, págs. 195-7.
 - LENNARD. Standard protocols for the construction of scFv libraries. Methods in molecular biology. 2002, n.º 178, págs. 59-71.
 - POLJAK. Production and structure of diabodies. Structure. 1994, vol. 2, n.º 12, págs. 1121-3.
 - 15 • HUDSON, y col. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. Journal of immunological methods. 1999, vol. 231, n.º 1-2, págs. 177-89.
 - KIPRIYANOV. Generation of bispecific and tandem diabodies. Methods in molecular biology. 2002, n.º 178, págs. 317-31.
 - HOLLIGER, y col. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology, 2005, vol. 23, n.º 9, págs. 1126-36.
 - 20 • HOOGENBOOM, y col. Natural and designer binding sites made by phage display technology. Immunology today. 2000, vol.21, n.º 8, págs. 371-8.
 - MARKS, y col. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. Biotechnology. 1992, vol.10, n.º 7, págs. 779-83
 - 25 • BARBAS, y col. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994, vol. 91, n.º 9, págs. 3809-13.
 - SCHIER. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. Gene. 1996, vol. 169, n.º 2, págs. 147-55
 - 30 • YELTON. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. J. immunol. 1995, vol.155, n.º 4, págs. 1994-2004
 - JACKSON, y col. In vitro antibody maturation. Improvement of a high affinity, neutralizing antibody against IL-1 beta. J. immunol. 1995, vol.154, n.º 7, págs. 3310-9.
 - HAWKINS, y col. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. Journal of molecular biology. 1992, vol. 226, n.º 3, págs. 889-96.
 - 35 • SMITH, y col. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. 1981, n.º 147, págs. 195-7.
 - BRENNAN, y col. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. Science, 1985, vol. 229, n.º 4708, págs. 81-3.
 - 40 • SHALABY, y col. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. The Journal of experimental medicine. 1992, vol.175, n.º 1, págs. 217-25.
 - KOSTELNY, y col. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J. immunol. 1992, vol.148, n.º 5, págs. 1547-33.
 - 45 • ZAPATA, y col. Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in Escherichia coli and enhanced antiproliferative activity. Protein engineering. 1995, vol. 8, n.º 10, págs. 1057-62.
 - HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996.

- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996 págs. 118-228.
- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996 págs. 229-285.
- FELGNER, y col. Cationic liposome mediated transfection. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 1989, vol.32, págs. 115-21
- 5 • HODGSON, y col. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. Nature Biotechnology, 1996, vol.14, n.º 3, págs. 339-42
- REMY, y col. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. Bioconjugate chemistry. 1994, vol. 5, n.º 6, págs. 647-54.
- 10 • LATHE, y col. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. Gene. 1987, vol. 57, n.º 2-3, págs. 193-201.
- LUPTON, y col. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. Molecular and cellular biology. 1985, vol. 5, n.º 10, págs. 2533-42.
- 15 • YATES, y col. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature. 1985, vol.313, n.º 6005, págs. 812-5.
- SUMMERS, y col. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. Cell. 1984, vol.36, n.º 4, págs. 1097-103.
- SUTTER, y col. Non replicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, vol. 89, n.º 22, págs. 10847-51.
- 20 • MEYER, y col. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. The Journal of general virology. 1991, vol. 72, n.º Pt5, págs. 1031-8.
- SUTTER, y col. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. Vaccine. 1994, vol.12, n.º 11, págs. 1032-40.
- 25 • GRAHAM, y col. Methods in molecular biology. Editado por MURREY. The human press inc, 1991: págs. 109-128.
- ZAKHARCHUK, y col. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA. Archives of virology. 1993, vol. 128, n.º 1-2, págs. 171-6.
- 30 • SPIBEY, y col. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2. The Journal of general virology. 1989, vol. 70, n.º Pt 1, págs. 165-72
- JOUVENNE, y col. Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes. Gene. 1987, vol.60, n.º 1, págs. 21-8
- MITTAL, y col. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. The Journal of general virology. 1995, vol. 76, n.º Pt 1, págs. 93-102.
- 35 • BISCHOFF, y col. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science, 1996, vol. 274, n.º 5286, págs. 373-6
- HEISE, y col. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. Nature Medicine. 2000, vol. 6, n.º 10, págs. 1134-9.
- 40 • FUEYO, y col. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. Oncogene. 2000, vol. 19, n.º 1, págs. 2-12.
- MCIVOR. Purina nucleósido fosforilasa y adenosina desaminasa humanas: transferencia génica en células cultivadas y hemocitoblastos de murino utilizando retrovirus anfotrópicos recombinantes. Molecular and cellular biology. 1987, vol. 7, n.º 2, págs. 838-46.
- 45 • TABIN, y col. Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Molecular and cellular biology. 1982, vol. 2, n.º 4, págs. 426-36.
- TAKEBE, y col. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Molecular and cellular biology. 1988, vol. 8, n.º 1, págs. 466-72.

- CHEN, y col. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. *The Journal of clinical investigation*. 1995, vol. 96, n.º 6, págs. 2775-82.
- 5 • SCHREWE, y col. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and cellular biology*. 1990, vol.10, n.º 6, págs. 2738-48.
- VILE, y col. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer res.* 1993, vol. 53, n.º 17, págs. 3860-4.
- 10 • HARRIS, y col. Gene therapy for cancer using tumor-specific prodrug activation. *Gene therapy*. 1994, vol. 1, n.º 3, págs. 170-5.
- KANAI, y col. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer res.* 1997, vol. 57, n.º 3, págs. 461-5.
- PEREZ. Principles and practice of radiation oncology. 2ª edición, LIPPINCOTT, 1992.
- 15 • KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987,15(20): 8125-8148.
- CHOTHIA y LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) *J Mol Biol.* 20 de agosto de 1987;196(4):901-17.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Transgene S.A.
- 20 <120> Anticuerpo contra el CSF-1R
- <130> U1109 PCT S3
- <150> 13/026.944
- <151> 14-02-2011
- <160> 47
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1404
- <212> ADN
- <213> Mus musculus
- 30 <400> 1

ES 2 654 551 T3

atgtacttgg gactgaacta tgtattcata gtttttctcc taaatgggtg ccagagtgaa 60
 gtgaagcttg aggagtctgg aggaggcttg gtgcagcctg gaggatccat gaaactctct 120
 tgtgctgcct ctggattcac ttttagtgac gcctggatgg actgggtccg ccagtctcca 180
 gagatgggac ttgagtgggt tgctgaaatt agaagcaaag ctaataatca tgcaacattc 240
 tatgctgagt ctgtgaaagg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtagtgtc 300
 tacctgcaaa tgaacagctt aagacctgaa gacactggca tttattactg taccagggta 360
 aaggtaggct ttgacaactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agccaaaaca 420
 acagcccat cggtctatcc actggccct gtgtgtggag atacaactgg ctctcggtg 480
 actctaggat gcctgggtcaa gggttatttc cctgagccag tgacctgac ctggaactct 540
 ggatccctgt ccagtgggtg gcacacctc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 600
 ctgagcagct cagtgactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 660
 gtggcccacc cggcaagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgagcccag aggcccaca 720
 atcaagccct gtccctccatg caaatgccca gcacctaac tcttgggtgg accatccgtc 780
 ttcactctcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 840
 tgtgtggtg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 900
 aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc 960
 cgggtggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 1020
 tgcaaggtca acaacaaaga cctcccagcg cccatcgaga gaacctctc aaaacccaaa 1080
 gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1140
 aaacaggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttactgtggag 1200
 tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260
 gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320
 aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380
 ttctcccga ctccgggtaa atga 1404

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

5

<400> 2

ES 2 654 551 T3

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

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

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Met Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe
 65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly
 115 120 125

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

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
 145 150 155 160

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

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

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr

ES 2 654 551 T3

	195							200								205
Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	
	210					215					220					
Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	
	225				230					235					240	
Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	
				245					250					255		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	
			260					265					270			
Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	
		275					280					285				
Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	
	290					295					300					
His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	
	305				310					315					320	
Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	
				325					330					335		
Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
			340					345					350			
Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	
		355					360					365				
Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	
	370					375					380					
Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	
	385				390					395					400	
Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	
				405					410					415		
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	
			420					425					430			
Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	
		435					440					445				

ES 2 654 551 T3

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

Pro Gly Lys
 465

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

<400> 3

```

atgagtgtgc ccaactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt      60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc      120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag      180
ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca      240
aggttcagtg gcagtggtgc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct      300
gaagatthttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctctcggac gttcgggtga      360
ggcaccaagt tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttoccacca      420
tccagtgagc agttaacatc tggaggtgoc tcagtcgtgt gottottgaa caacttctac      480
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg      540
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag      600
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca      660
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag                          705
    
```

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

<400> 4

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 654 551 T3

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

5 <400> 5

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

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

10 <400> 6

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

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

15 <400> 7

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

ES 2 654 551 T3

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT

ES 2 654 551 T3

<213> Mus musculus

<400> 8

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

Asp Ala Arg Cys
 20

5 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10

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

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

15

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

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

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

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp
1 5

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

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

15 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 13

Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn
1 5

20 <210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 14

25 Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
1 5

<210> 15
<211> 3

ES 2 654 551 T3

<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 15

Ala Ala Thr
1

5 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 16

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr
1 5

10 <210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 17

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

20 <210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 18

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

Val Lys Gly

25 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 19

Val Lys Val Gly Phe Asp Asn
1 5

30 <210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 20

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

ES 2 654 551 T3

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
5 <400> 21

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Mus musculus
<400> 22

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Mus musculus
<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Mus musculus
<400> 24

Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Mus musculus
<400> 25

Val Lys Val Gly Phe Asp Asn
1 5

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Mus musculus
35 <400> 26

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

<210> 27
<211> 7
<212> PRT

ES 2 654 551 T3

<213> Mus musculus

<400> 27

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 28

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr
1 5

10

<210> 29
<211> 972
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

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

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

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

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

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

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

15

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 654 551 T3

Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
595 600 605

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
610 615 620

Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
625 630 635 640

Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
645 650 655

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
805 810 815

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

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

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 30
- <211> 36
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 5
- <220>
- <223> secuencia del cebador
- <400> 30
- gccgccacca tgtactggg actgaactat gtattc 36
- 10
- <210> 31
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15
- <223> secuencia del cebador
- <400> 31
- ggagatcttc atttaccgg agtccggga 29
- <210> 32
- <211> 33
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia del cebador
- <400> 32
- 25
- gccgccacca tgagtgtgcc cactcaggtc ctg 33
- <210> 33

ES 2 654 551 T3

<211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> secuencia del cebador

<400> 33
 gcccgggcta acactcattc ctgtgaagc tc 32

10
 <210> 34
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de ácido nucleico de una cadena ligera de anticuerpo

<400> 34

atgagcgtgc ccaccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60
gacatccaga tgaccagag ccccgccagc ctgagcgtga gcgtgggcga gaccgtgacc 120
atcacctgca gggccagcga gaacatctac agcaacctgg cctggtatca gcagaagcag 180
ggcaagagcc ccagctgct ggtgcacgct gccaccaacc tggccgacgg cgtgcctcc 240
aggttcagcg gcagcggctc cggcaccag tacagcctga agatcaacag cctgcagagc 300
gaggacttcg gcagctacta ctgccagcac ttctggggca cccaaggac cttcggcggc 360
ggcaccaagc tggagatcaa gaggaccgtg gccgccccca gcgtgttcat cttcccccc 420
agcgcagagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caactctac 480
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 540
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tocacctaca gcctgagcag cacctgacc 600
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgct gcgaggtgac ccaccagggc 660
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gttga 705

15

<210> 35
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> secuencia de ácido nucleico de una cadena pesada de anticuerpo

<400> 35

ES 2 654 551 T3

atgtacctgg gcttgaacta cgtgttcacg gtgtttctgc tgaacggcgt gcagagcgag 60

gtgaagctgg aggaaagcgg cggagggctg gtgcagccag gcgggagcat gaaactgtcc 120

tgcgccgcca gcggttcac cttcagcgac gcctggatgg actgggtgcg ccagagcccc 180

gagatgggcc tggagtgggt ggccgagatc aggtccaagg ccaacaacca cgccaccttc 240

tacgccgaga gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acgacagcaa gagcagcgtg 300

tacctgcaga tgaacagcct gaggcccgag gacaccggca tctactactg caccagagtg 360

aaagtgggct tcgacaactg gggccagggc accacactga ccgtgtccag cgccagcacc 420

aagggcccca gcgtgttccc cctggccccc agctccaaga gcaccagcgg aggaacagct 480

gctctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ttggaacagc 540

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgacagagcag cggcctgtac 600

agcctgagca gcgtgggtgac agtgcccagc agcagcctgg gcaccagac ctacatctgc 660

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 720

gacaagacc acacctgtcc tcctgcccga gcccagagc tgctggggcg accctccgtg 780

ttcctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcaggacccc cgaggtgacc 840

tgctgtgtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtataa cagcacctac 960

agggtgggtg ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggaatacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1080

ggccagccac gggagcccca ggtgtacacc ctgccccct cccgggacga gctgaccaag 1140

aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccagc gctggacagc 1260

gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcaggtg gcagcagggc 1320

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1380

ctgagcctgt cccccggcaa gtga 1404

<210> 36

<211> 1395

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de ácido nucleico de una cadena pesada de anticuerpo

<400> 36

ES 2 654 551 T3

atgtacctgg gcctgaacta cgtgttcata gtgtttctgc tgaacggcgt gcagagcgag 60
 gtgaagctgg aggaaagcgg cggagggctg gtgcagcctg gaggaagcat gaagctgtcc 120
 tgcgctgcca gcggcttcac cttcagcgac gcctggatgg actgggtgcg ccagagcccc 180
 gagatggggc tggagtgggt ggccgagatc aggtccaagg ccaacaacca cgccaccttc 240
 tacgccgaga gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acgacagcaa gagcagcgtg 300
 tacctgcaga tgaacagcct gaggcccgag gacaccggca tctactactg caccagagtg 360
 aaggtgggct tcgacaactg gggccagggc accacactga ccgtgtccag cgccagcacc 420
 aagggcccaa gcgtgttccc cctggccccc tgcagcagaa gcaccagcga gagcagacc 480
 gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccc tgaccgtgtc ttggaacagc 540
 ggagccctga ccagcggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 600
 agcctgagca gcgtggtgac cgtgccccagc agcagcctgg gcaccaagac ctacacctgc 660
 aacgtggacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga ggggtggagag caagtacggc 720
 ccaccctgcc cctcttgccc agcccccgag ttctctggcg gaccacagct gttcctgttc 780
 ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcaggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg 840
 gtggacgtgt cccaggaaga tccagaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gaacagttta acagcaccta caggggtggtg 960
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc 1020
 tccaacaagg gcctgccccag ctccatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca 1080
 cgggagcccc aggtgtacac cctgccaccc agccaagagg aatgaccaa gaaccaggtg 1140
 tcctgacct gtctggtgaa gggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccag tgctggacag cgacggcagc 1260
 ttcttctgt acagcaggct gaccgtggac aagtccaggt ggcaggaagg caacgtcttt 1320
 agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca ccagaagag cctgagcctg 1380
 tcctgggca agtga 1395

<210> 37

<211> 467

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo

<400> 37

ES 2 654 551 T3

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

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

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

ES 2 654 551 T3

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

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly
115 120 125

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

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

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

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

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

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
465

<210> 38

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo

<400> 38

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

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

ES 2 654 551 T3

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

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Met Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe
 65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly
 115 120 125

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

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

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

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

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 465

- <210> 39
- <211> 234
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo
- <400> 39

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

ES 2 654 551 T3

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

<210> 40
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 654 551 T3

<223> secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo

<400> 40

ES 2 654 551 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 41
<211> 234

ES 2 654 551 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo

5

<400> 41

```

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

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

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

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

Lys Leu Leu Leu His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
 65          70          75

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85          90          95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100         105         110

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

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165         170         175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180         185         190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195         200         205

```

ES 2 654 551 T3

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

- <210> 42
- <211> 118
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo
- <400> 42

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

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

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

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

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 10 <210> 43
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 15 <223> secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo
- <400> 43

ES 2 654 551 T3

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo

<400> 44

ES 2 654 551 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

His Ala Ala Thr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo

<400> 45

ES 2 654 551 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo

<400> 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
 35 40 45

ES 2 654 551 T3

His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> se cuencia de aminoácidos de CSF1 humano

<400> 47

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

ES 2 654 551 T3

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
 180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
 195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
 210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
 225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Ala Pro Pro Arg Ser
 245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300

Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
 305 310 315 320

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
 355 360 365

Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
 370 375 380

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
 385 390 395 400

ES 2 654 551 T3

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg
435 440

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, recombinante o purificado que se une específicamente a CSF-1R, más preferentemente CSF-1R humano, **caracterizado porque** dicho anticuerpo comprende:
 - 5 (i) (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO 42 y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:44; o
 - (ii) (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO:43, y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:45; o
 - (iii) (a) una primera región variable que consiste en la SEQ ID NO:42, y (b) una segunda región variable que consiste en la SEQ ID NO:46.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1 (i), en el que este comprende (a) una cadena pesada que consiste en la SEQ ID NO:37 y (b) una cadena ligera que consiste en la SEQ ID NO:39.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 (ii), en el que este comprende (a) una cadena pesada que consiste en la SEQ ID NO:38, y (b) una cadena ligera que consiste en la SEQ ID NO:40.
- 15 4. El anticuerpo de la reivindicación 1 (iii), en el que este comprende (a) una cadena pesada que consiste en la SEQ ID NO:37 y (b) una cadena ligera que consiste en la SEQ ID NO:41.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un fragmento de unión a antígeno o un diacuerpo.
6. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 6.
- 20 8. El vector de la reivindicación 7, que es de origen plásmido o vírico.
9. El vector de la reivindicación 8, que es de origen vírico y que se deriva de un poxvirus, un adenovirus, un retrovirus, un herpesvirus, un alfavirus, un espumavirus o un virus adenoasociado.
10. El vector de la reivindicación 9, en el que dicho poxvirus es un virus vaccinia o un virus de la viruela del canario.
11. El vector de la reivindicación 10, en el que dicho virus vaccinia es un MVA.
- 25 12. Una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 6.
13. La célula de la reivindicación 12, que es una célula eucariota.
14. La célula de la reivindicación 13, en la que dicha célula eucariota es una célula de mamífero, preferentemente una célula CHO o una célula BHK.
- 30 15. Un procedimiento de producción de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende cultivar una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo y la purificación del anticuerpo a partir de la célula o el medio que rodea la célula.
16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 6 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 17. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 6, el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 16 para su uso como medicamento.
- 40 18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 6, el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, una enfermedad asociada a una actividad aumentada de los osteoclastos, una enfermedad inflamatoria y artritis reumatoide.

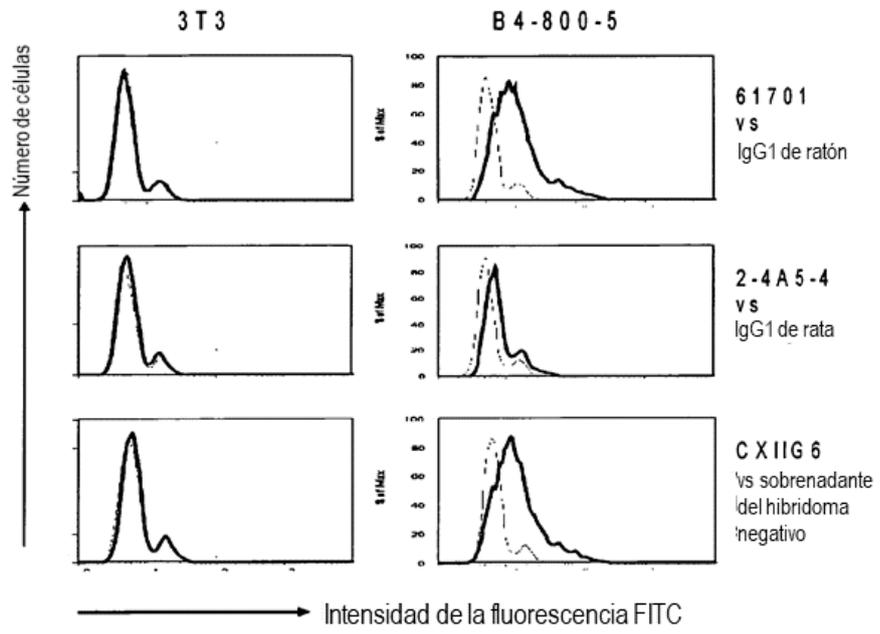


Fig. 1

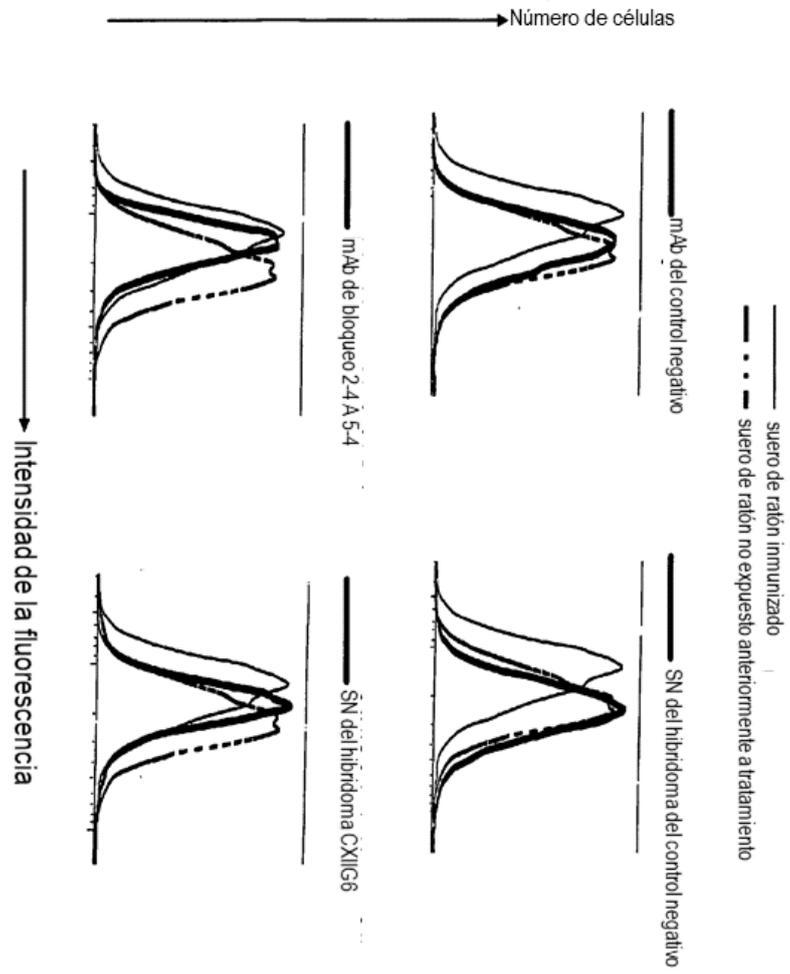


Fig. 2

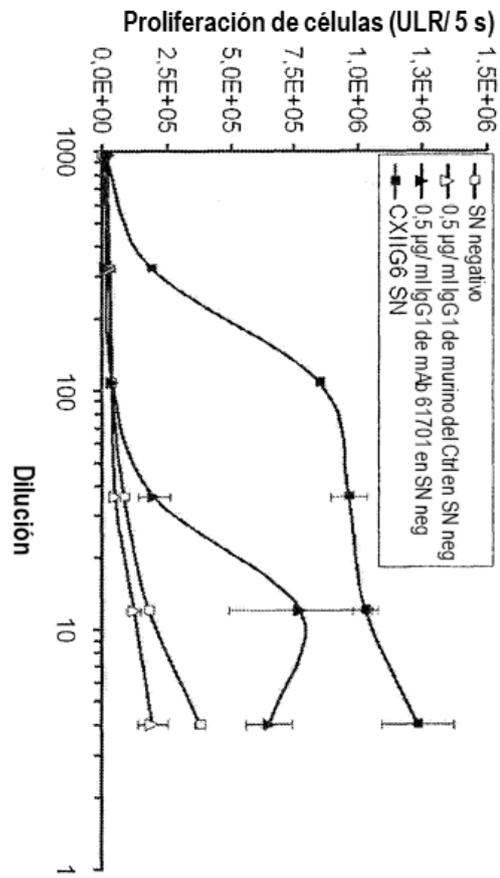
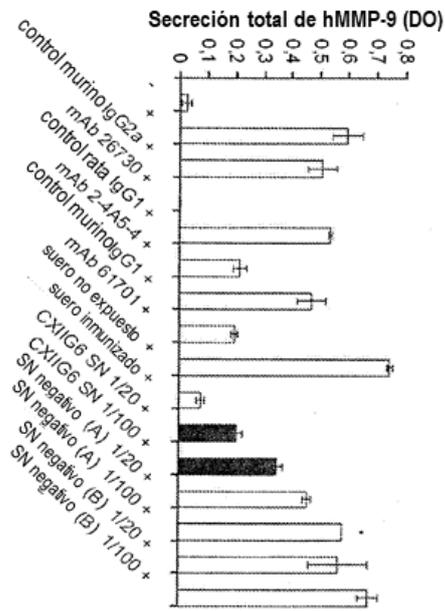


Fig. 3

Fig. 4



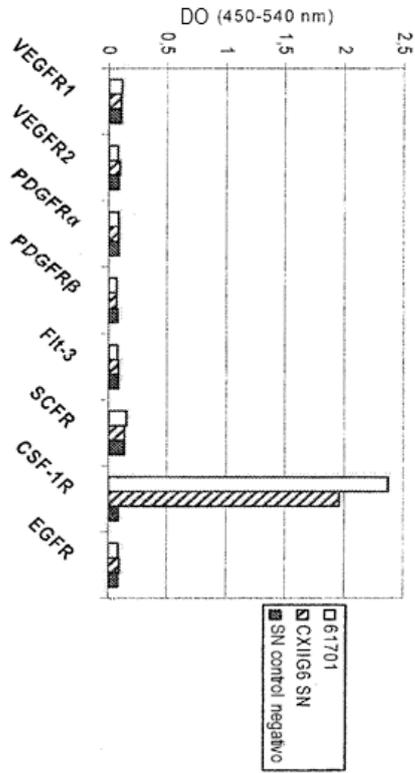


Fig. 5

*Sfi*I
 GGCCCAGCCGGCCAGTGACAGACACAGACATAGAACATTCACGATGACTTGGGACTGA 60
 M Y L G L N
 ACTATGTATTTCATAGTTTTTCTCCTAAATGGTGTCCAGAGTGAAGTGAAGCTTGAGGAGT 120
 Y V F I V F L L N G V Q S E V K L E E S
 CTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGATCCATGAACTCTCTTGTGCTGCCCTCTGGAT 180
 G G G L V Q P G G S M K L S C A A S G F
 TCACITTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGTCCGCCAGTCTCCAGAGATGGGACTTGAGT 240
 T F S D A W M D W V R Q S P E M G L E W
 GGGTTGCTGAAATAGAAAGCAAAGCTAATAATCATGCAACATCTATGCTGAGTCTGTGA 300
 V A E I R S K A N N H A T F Y A E S V K
 AAGGGAGGTTACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAATGAACA 360
 G R F T I S R D D S K S S V Y L Q M N S
 GCTTAAGACCTGAAGACACTGGCATTATTTACTGTACCAGGGTAAAGGTAGGCTTTGACA 420
 L R P E D T G I Y Y C T R V K V G F D N
 ACTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCT 480
 W G Q G T T L T V S S A K T T A P S V Y
 ATCCACTGGCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGG 540
 P L A P V C G D T T G S S V T L G C L V
 TCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGTG 600
 K G Y F P E P V T L T W N S G S L S S G
 GTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCCCTCAGCAGCTCAGTGA 660
 V H T F P A V L Q S D L Y T L S S S V T

*Xho*I
 CTGTAACCTCGAGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCACCCGGCAA 720
 V T S S T W P S Q S I T C N V A H P A S
 GCAGCACCAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTC 780
 S T K V D K K I E P R G P T I K P C P P
 CATGCAAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCAA 840
 C K C P A P N L L G G P S V F I F P P K
 AGATCAAGGATGTAATCATGATCTCCCTGAGCCCATAGTACATGTGTGGTGGTGGATG 900
 I K D V L M I S L S P I V T C V V V D V
 TGAGCGAGGATGACCCAGATGCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACA 960
 S E D D P D V Q I S W F V N N V E V H T
 CAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAAGTCC 1020
 A Q T Q T H R E D Y N S T L R V V S A L
 TCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTCAAAATGCAAGGTCAACAACA 1080
 P I Q H Q D W M S G K E F K C K V N N K
 AAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAAGAGCTC 1140
 D L P A P I E R T I S K P K G S V R A P
 CACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGA 1200
 Q V Y V L P P P E E E M T K K Q V T L T
 CCTGCATGGTACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGA 1260
 C M V T D F M P E D I Y V E W T N N G K
 AAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCACTCCTGGACTCTGATGGTCTTACTTCA 1320
 T E L N Y K N T E P V L D S D G S Y F M
 TGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAATAGCTACTCCTGTT 1380
 Y S K L R V E K K N W V E R N S Y S C S
 CAGTGGTCCAGAGGGTCTGCACAAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGACTCCGG 1440
 V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G

*Not*I
 GTAATGAGCTCAGCACCCACAAAACCTCAGGTCCAAAGAGACACCCAGCGGCCGC 1498
 K *

Fig. 6

ES 2 654 551 T3

SfiI
GGCCCAGCCGGCCGGAGTCAGCCTCACACTGATCACACACAGACATGAGTGTGCCCACTC 60
M S V P T Q

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACCACCAGCT 788
K S F N R N E C *

NotI
GCGGCCGC 788

Fig. 7

pTG17753

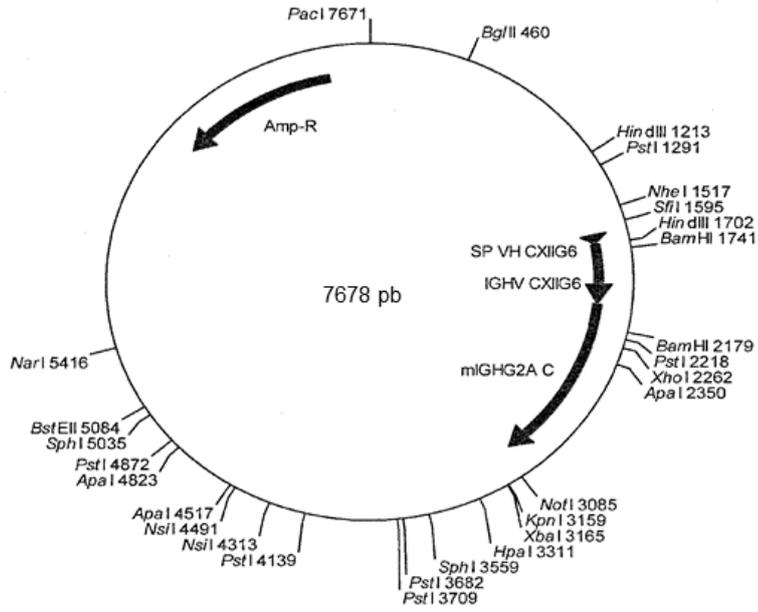


Fig. 8

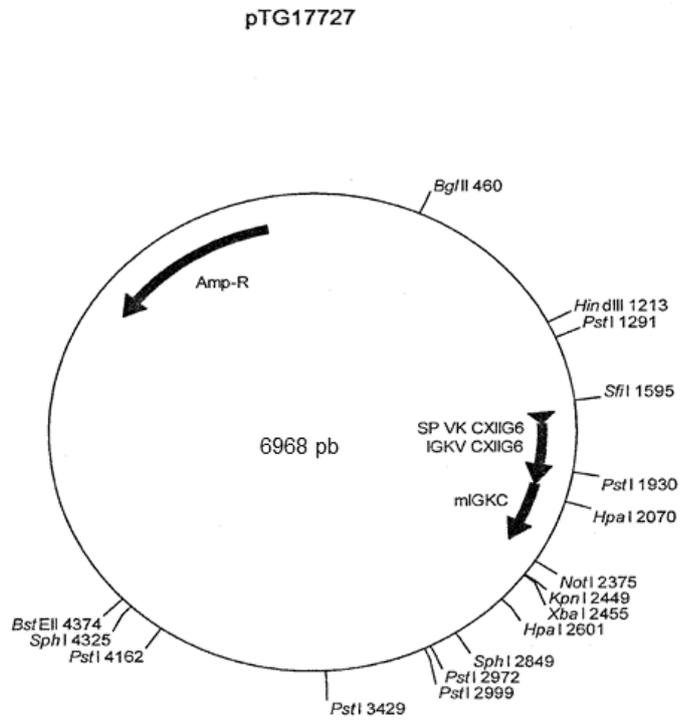


Fig. 9

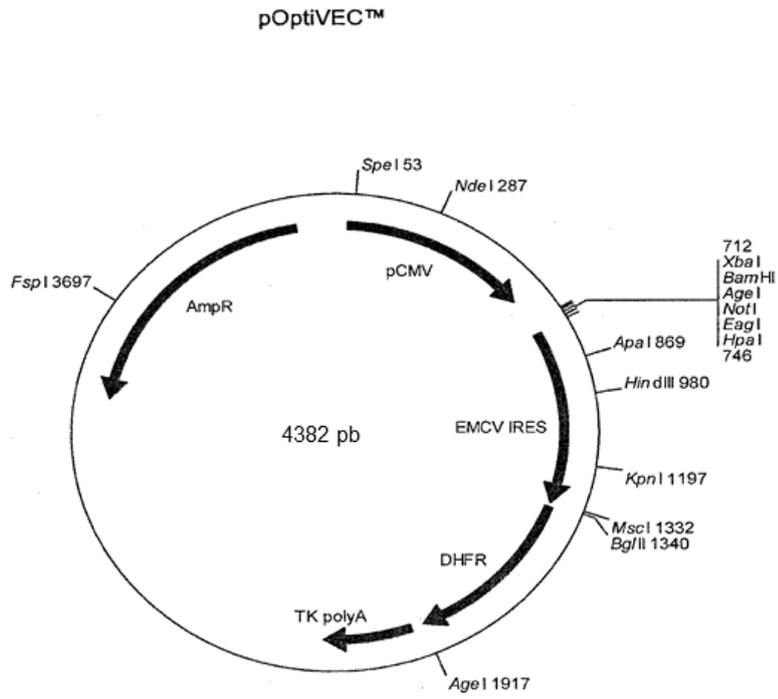


Fig. 10

pTG17895

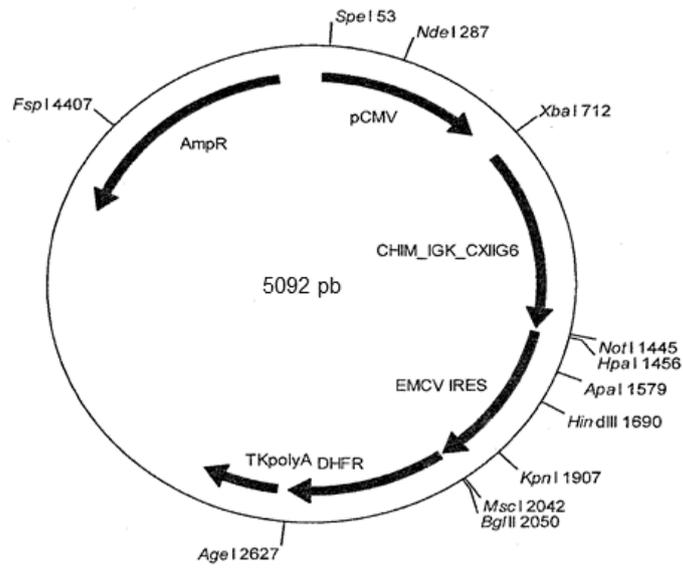


Fig. 11

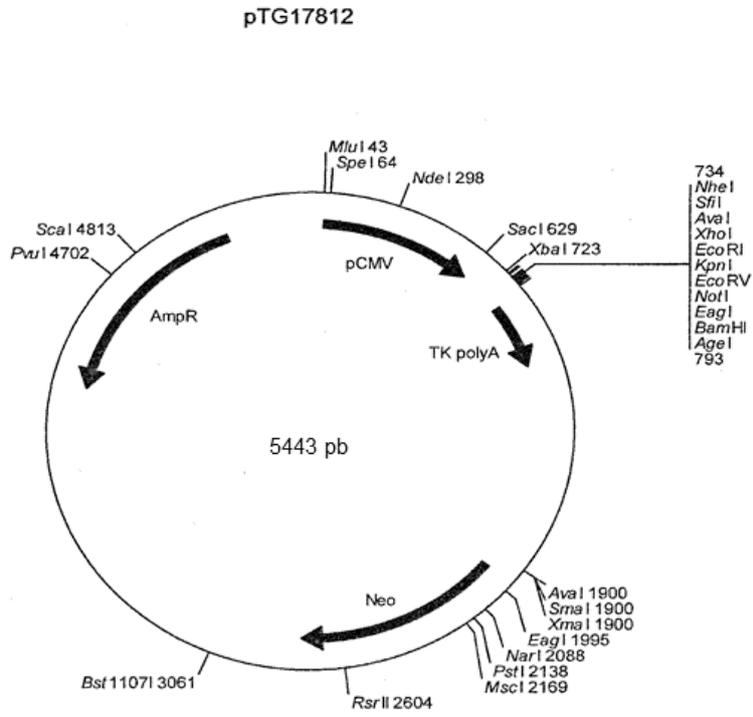


Fig. 12

pTG17868

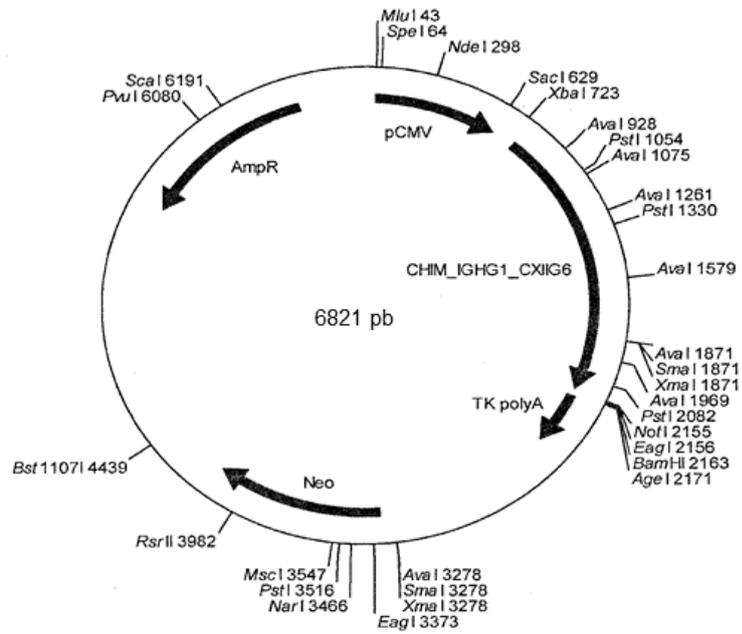


Fig. 13

pTG17869

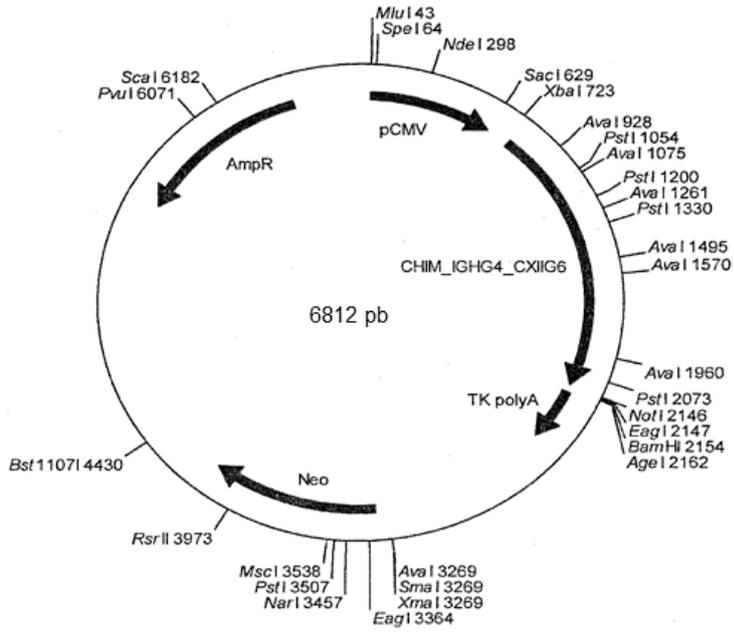


Fig. 14

		Aminoácidos sustituidos ^a en VL CXIIIG																			
K1	PTG17896	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K2	PTG17897	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S		G84A	S85T	G100Q
K3	PTG17899	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L			A55E	D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S		G84A	S85T	G100Q
K4	PTG17900	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K		H49Y	N53R	A55E	D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S			S85T	G100Q
K5	PTG17901	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K				A55E	D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S	S80P		S85T	G100Q
K6	PTG17902	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K				A55E	D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S			S85T	G100Q
K7	PTG17903	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K					D66S	Q70D	S72T		N76S				G100Q
K8	PTG17904			E17D																	G100Q
K9	PTG17905	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L				D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S		G84A	S85T	G100Q
K10	PTG17906	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K					D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S	S80P		S85T	G100Q
K11	PTG17907	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K					D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S			S85T	G100Q
K12	PTG17947	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40D										K74F	N76S	S80P			
K13	PTG17948	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40D	S43A	Q45K	V48L				D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K14	PTG17949	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P										K74F	N76S	S80P			
K15	PTG17950	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L				D66S	Q70D	S72T	K74F	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q

^aLos aminoácidos en negrita tienen una accesibilidad relativa al disolvente de la cadena secundaria por encima del 50%, subrayado, por encima del 25%

Fig. 15

Aminoácidos sustituidos^a en VL CXII G

H1	PTG17870	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	L114V	
H2	PTG17871	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	L114V	
H3	PTG17872	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	L114V	
H4	PTG17873	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V	
H5	PTG17874	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V	
H6	PTG17875	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V	
H7	PTG17883	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N	V81L	R89K			I95V	T113L	L114V	
H8	PTG17884	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N	V81L	R89K			I95V	T113L	L114V	
H9	PTG17885	K3Q	ESV		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N	V81L	R89K			I95V	T113L	L114V	
H10	PTG17886	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A	S79N	V81L	R89K			I95V	T113L	L114V	
H11	PTG17887	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V	
H12	PTG17888	K3Q	ESV		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V	
H13	PTG17889				K19R										R89K				T113L	L114V	
H14	PTG17890				K19R										R89K				T113L	L114V	
H15	PTG17891				K19R										R89K				T113L	L114V	
H16	PTG17892	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V	
H17	PTG17893	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V	
H18	PTG17894	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V	
H19	PTG17943	K3Q	ESV	M18L												P90A				L114V	
H20	PTG17944	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V	
H21	PTG17945	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V	
H22	PTG17946	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K				E64A			R89K		P90A		I95V	T113L	L114V
H23	PTG17968	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K				T113L	L114V	
H24	PTG17969	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K		P90A		T113L	L114V	
H25	PTG17970	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K		P90A		I95V	T113L	L114V
H26	PTG17985	K3Q	ESV	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K		P90T		T113L	L114V	
H27	PTG17986	K3Q	ESV	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K		P90T		I95V	T113L	L114V

^aLos aminoácidos en negrita tienen una accesibilidad relativa al disolvente de la cadena secundaria por encima del 50%, subrayado, por encima del 25%

Fig. 16

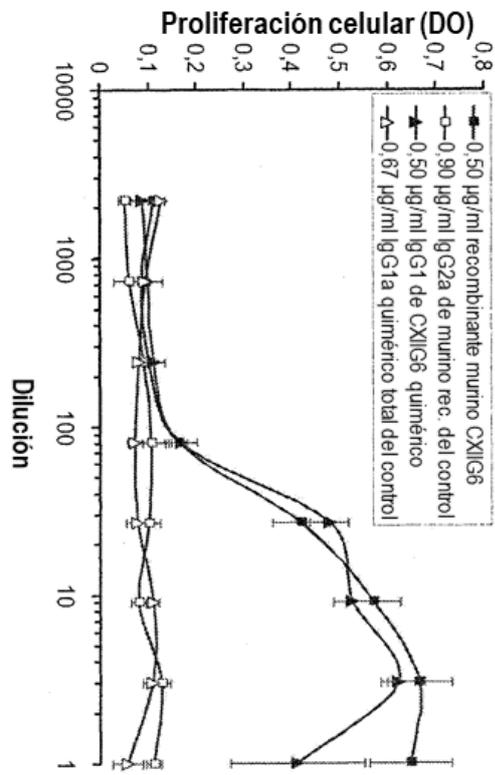


Fig. 17

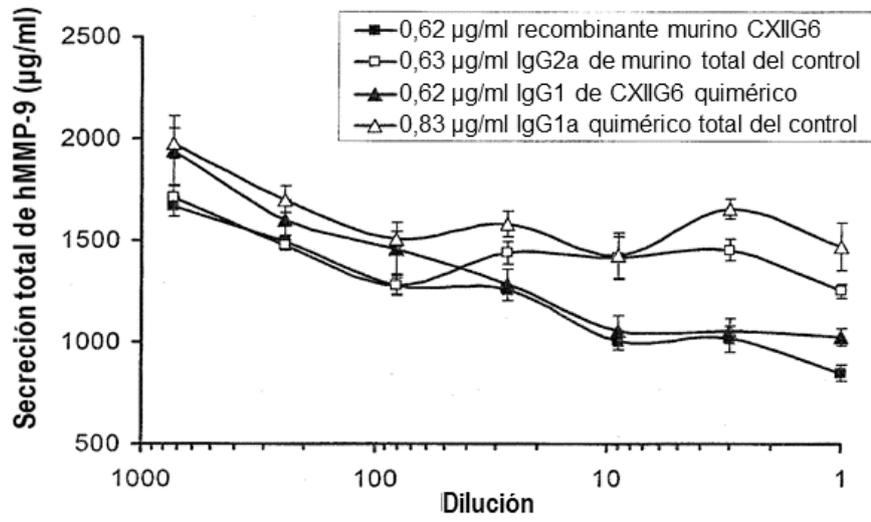


Fig. 18

Fig. 20

Subrayado en gris = CD115 de ratón

Subrayado en blanco = CD115 humano

	dominio 1 análogo a Ig (D1) aa 20 a 104	dominio 2 análogo a Ig (D2) aa 105 a 199	dominio 3 análogo a Ig (D3) aa 200 a 298
pTG17983	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG17984	APVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PEPPQ...QVVES
pTG17998	IPVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PEPPQ...QVVES
pTG17999	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PEPPQ...QVVES
pTG18003	APVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18001	APVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PGPPA...RVVES
pTG18005	APVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PEPPQ...QVVES
pTG18004	IPVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PGPPA...RVVES

	dominio 1 análogo a Ig (D1) aa 20 a 104			dominio 2 análogo a Ig (D2) aa 105 a 199	dominio 3 análogo a Ig (D3) aa 200 a 298
	aa20 to 41	aa42 to 90	aa91 to 104		
pTG18000	APVIE...TVTLR	CVGNG...EPGDP	LGGSA...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18002	APVIE...TVTLR	CVSNG...ELEDP	LGGSA...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18013	IPVIE...TVTLR	CVGNG...EPGDP	MAGST...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18014	APVIE...TVTLR	CVGNG...EPGDP	MAGST...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18015	IPVIE...TVTLR	CVSNG...ELEDP	LGGSA...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18016	IPVIE...TVTLR	CVSNG...ELEDP	MAGST...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES

	dominio 1 análogo a Ig (D1) aa 20 a 104	dominio 2 análogo a Ig (D2) aa 105 a 199	½ dominio 3 análogo a Ig (D3) aa 200 a 246
pTG18040	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...TKLAI
pTG18036	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	
	Ig-like domain 1 (D1) aa 20 a 104	½ Ig-like domain 2 (D2) aa 105 a 157	
pTG18039	IPVIE...YVKDP	ARPWN... NYSFS	
pTG18038	IPVIE...YVKDP		

Fig. 21: Curva de competición entre el anticuerpo ^{125}I -H27K15 y diversos anticuerpos respecto EI4-CD115

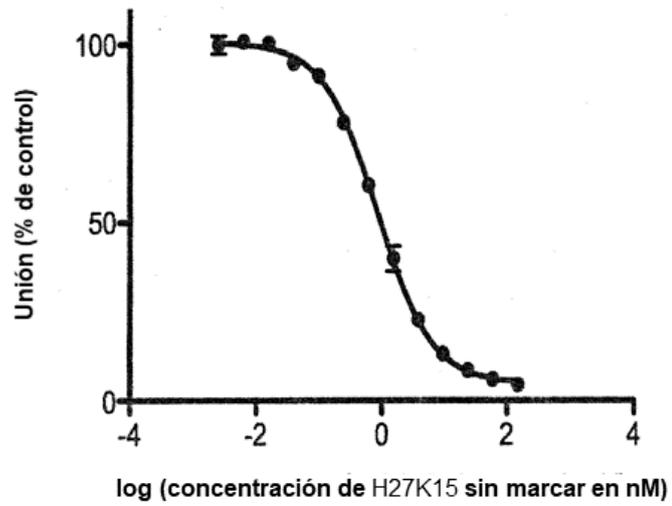


Fig. 22:
 Curva de competición entre el anticuerpo ^{125}I -H27K15 y diversos anticuerpos
 respecto E14-CD115

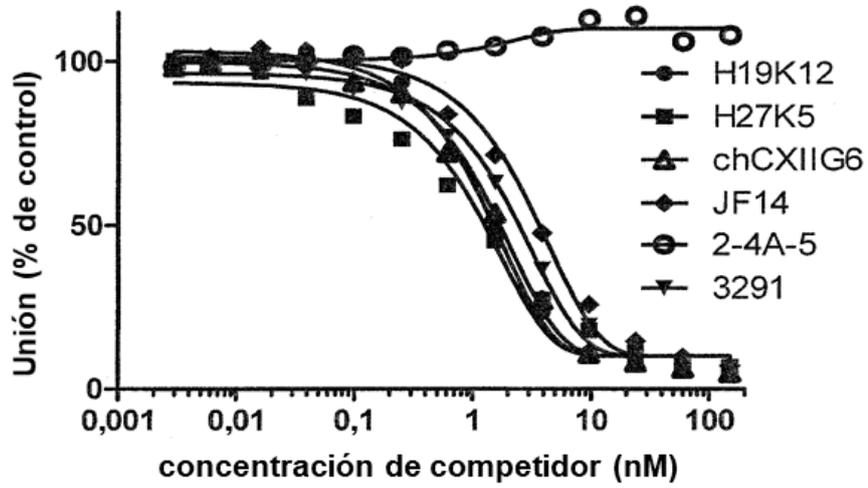


Fig. 23: Incubación posterior a la competición: CSF1 biot (1 hora), a continuación mAb (1 hora)

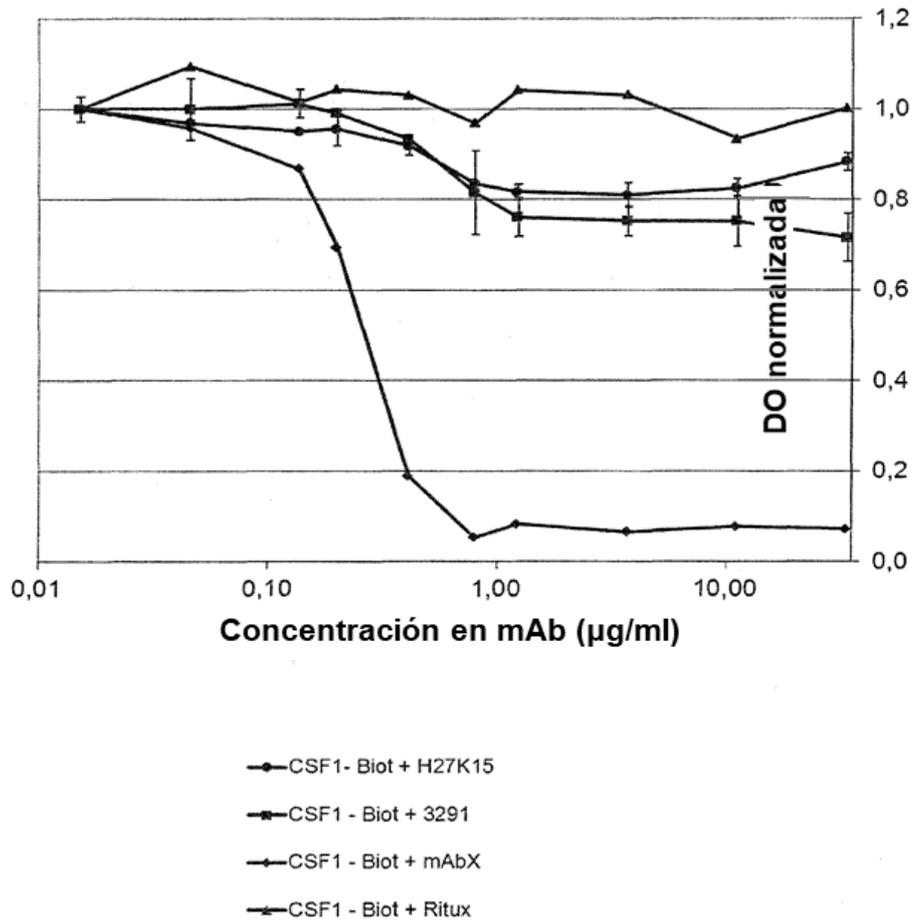
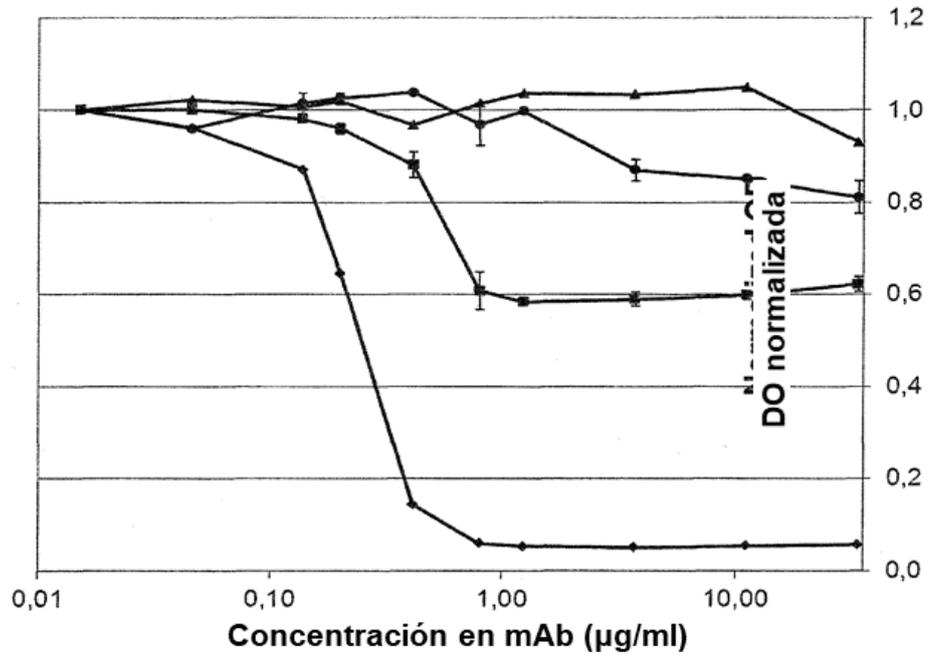


Fig. 24: Incubación previa a la competición: mAb (1 hora), a continuación CSF1-biot (1 hora)



- H27K15 + CSF1 - Biot
- 3291 + CSF1 - Biot
- ▲— mAbX + CSF1 - Biot
- ◆— Ritux + CSF1 - Biot

Fig. 25: Incubación simultánea a la competición: mAb y CSF1-biot juntos (1 hora)

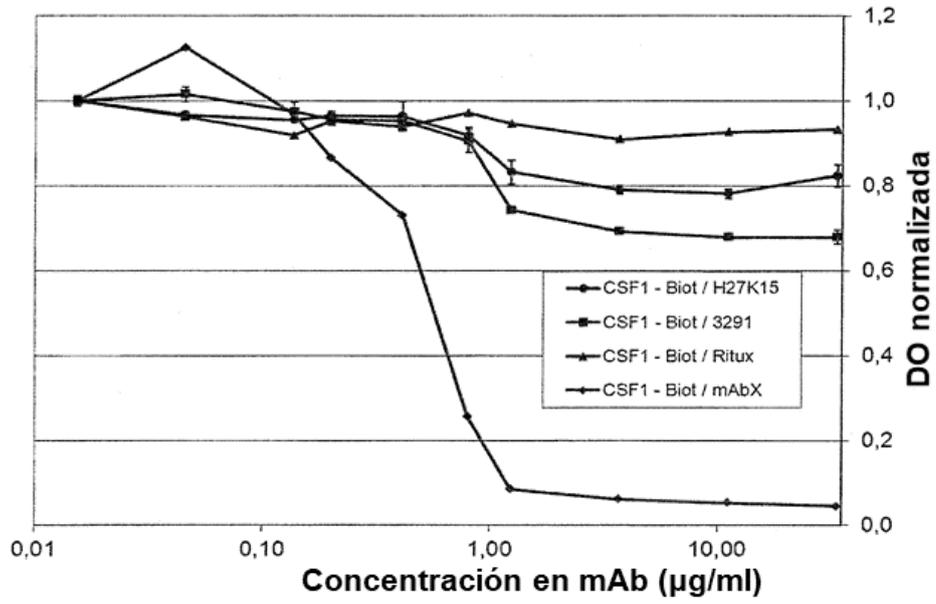


Fig. 26: Incubación con competición: mAb y hCD115 juntos
(1 h 45)

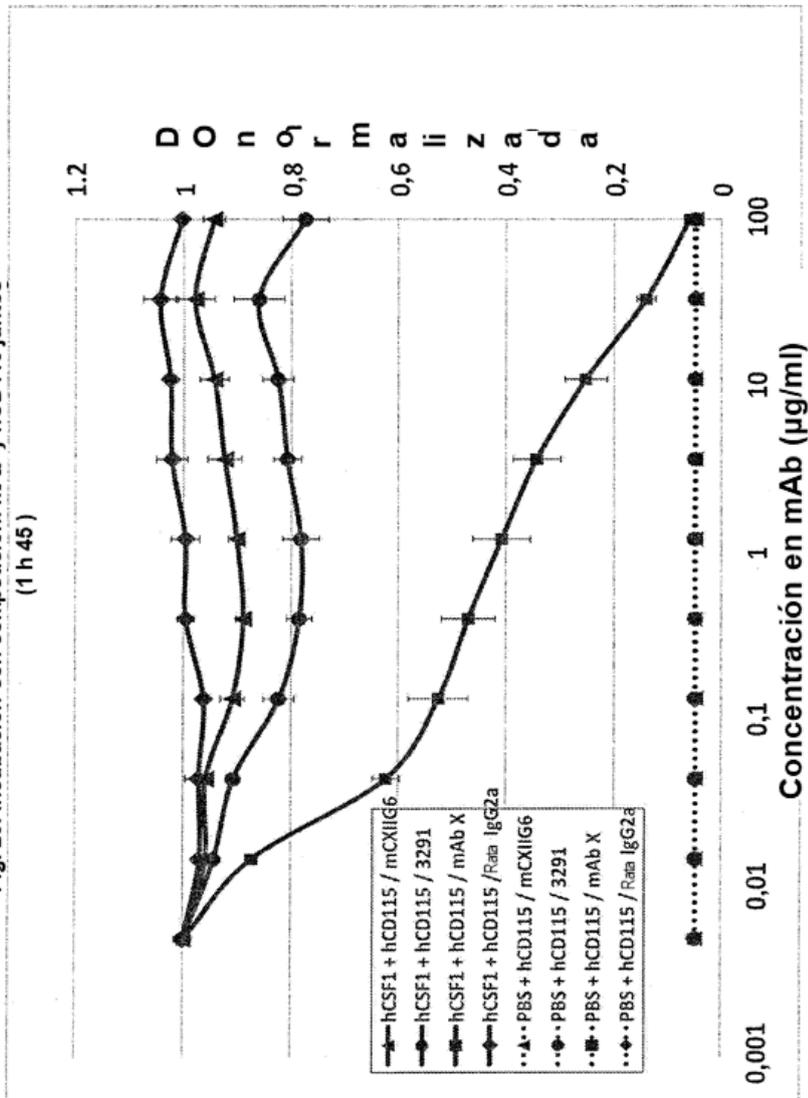
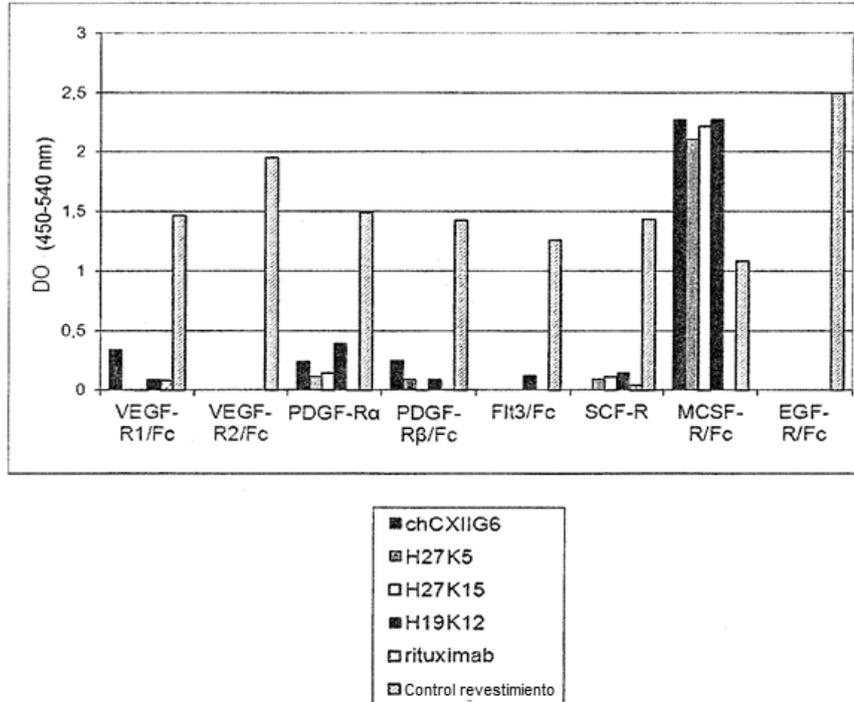


Fig. 27: Carencia de reactividad cruzada de variantes de HCXIIG6 con receptores de la tirosina quinasa de la subfamilia de tipo III diferente de CD115



Las barras corresponden a valores medidos a partir de pocillos únicos y son representativos de 2 experimentos independientes.

Fig. 28: Bloqueo de CD115 soluble por variantes de hCXIIIG6 y chCXIIIG6 en el ensayo basado en células M-NFS-60

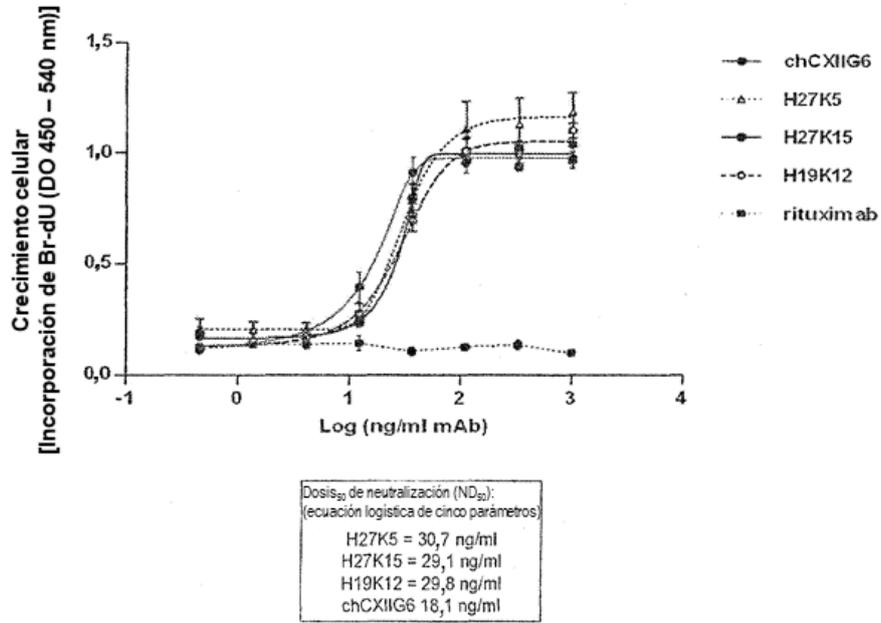
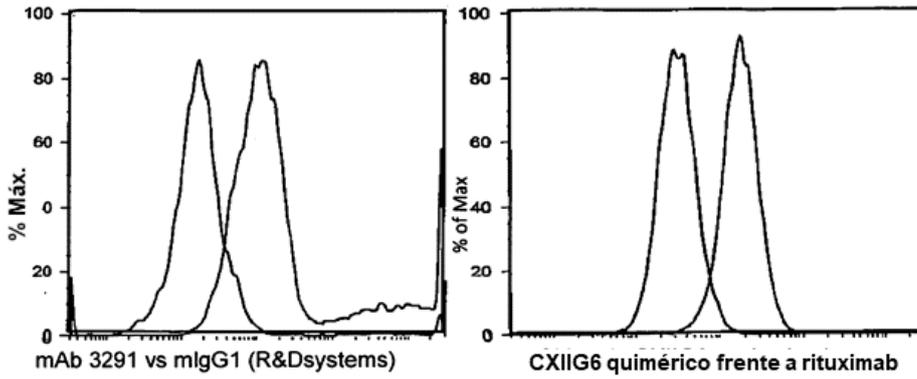


Fig. 29: Inhibición de la proliferación de células AML5 dependiente de CSF-1 por variantes de hCXIIIG6

29A: Las células AML5 expresan CD115 en la superficie



29B: El crecimiento de células AML5 está estimulado por CSF-1 en una manera dependiente de la dosis

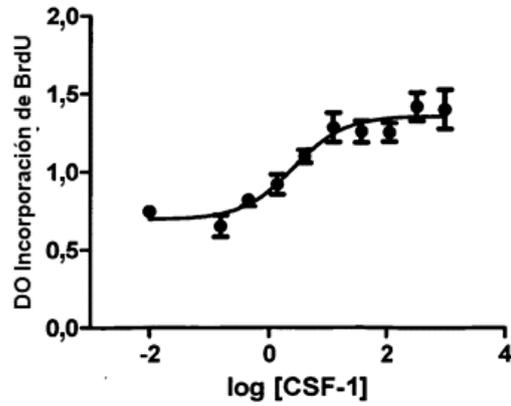
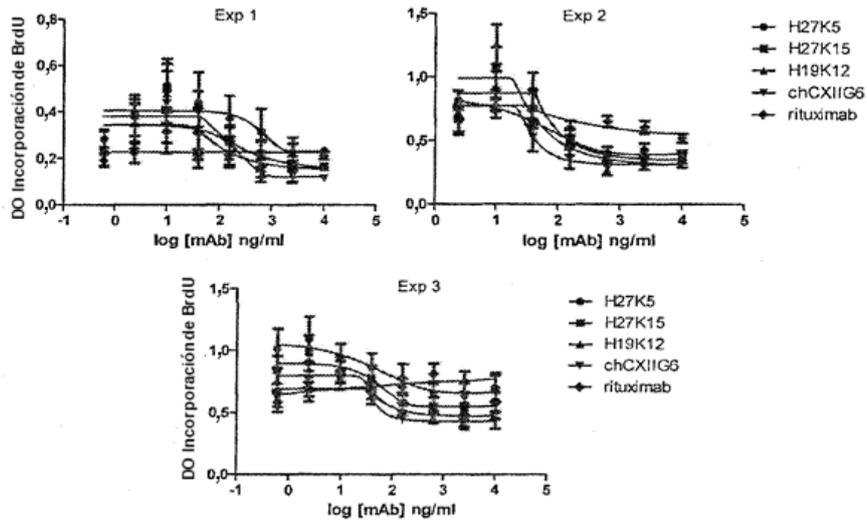


Fig. 29: Inhibición de la proliferación de células AML5 dependiente de CSF-1 por variantes de hCXIIIG6

29C: Las variantes de hCXIIIG6 y chCXIIIG6 inhiben la proliferación de las células AML5 dependiente de CSF-1

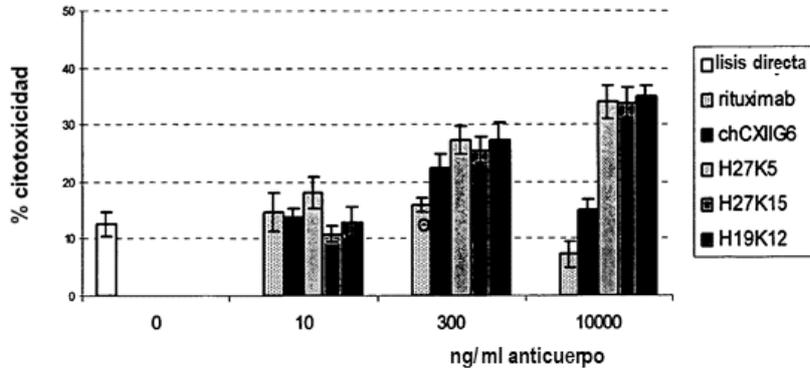


29D: valores de CE50 y R cuadrado calculados mediante GraphPad Prism a partir de los resultados que se muestran en C

	CE50 / R cuadrado			
	H27K5	H27K15	H19K12	chCXIIIG6
Exp 1	608 / 0,19	188 / 0,36	105 / 0,23	217 / 0,27
Exp 2	50 / 0,74	86 / 0,56	46 / 0,62	37 / 0,57
Exp 3	40 / 0,22	54 / 0,34	48 / 0,41	49 / 0,44

Fig. 30: Actividad de ADCC de variantes de hCXIIIG6 sobre las células EL4-CD115 diana

30A



30B

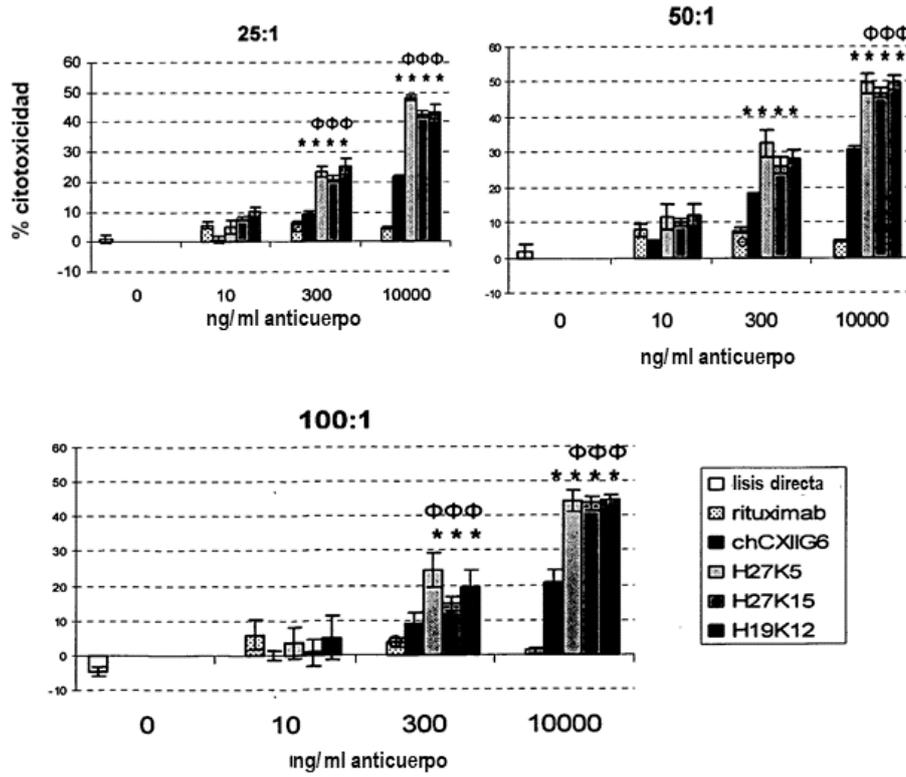
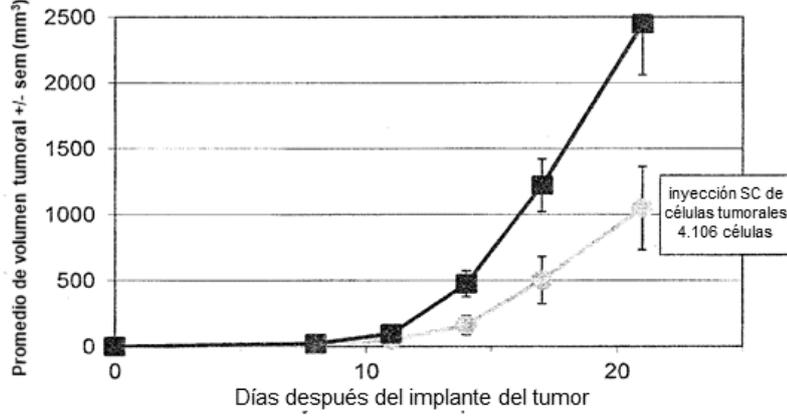


Fig. 31: Efecto terapéutico de CXIIIG6 quimérico en el modelo de tumor BeWo de coriocarcinoma

31A



31B

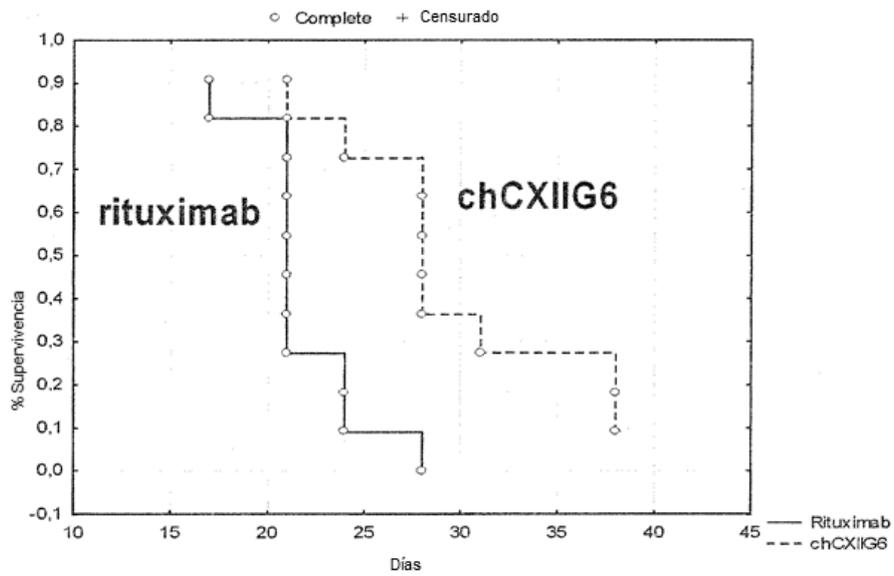


Fig. 32

secuencia "H27" – la correspondiente región variable está subrayada (SEQ ID NO: 37)

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly Val Gln
 Ser Glu

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
Leu Ser

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln
Ala Pro

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala
Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser
Ser Val

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
Arg Val

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 Ser Thr

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 Thr Ala

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 Asn Ser

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 Leu Tyr

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 Ile Cys

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 Ser Cys

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 Ser Val

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 Val Thr

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 Val Asp

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 Thr Tyr

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 Tyr Lys

ES 2 654 551 T3

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
Ala Lys

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
Thr Lys

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
Val Glu

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
Asp Ser

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
Gln Gly

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
Lys Ser

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

secuencia "H19" – la correspondiente región variable está subrayada (SEQ ID NO: 38)

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly Val Gln
Ser Glu

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys
Leu Ser

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln
Ser Pro

Glu Met Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala
Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser
Ser Val

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr
Arg Val

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
Ser Thr

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
Thr Ala

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
Asn Ser

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
Leu Tyr

ES 2 654 551 T3

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
Ile Cys

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
Ser Cys

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
Ser Val

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
Val Thr

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
Val Asp

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
Thr Tyr

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
Tyr Lys

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
Ala Lys

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
Thr Lys

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
Val Glu

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
Asp Ser

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
Gln Gly

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
Lys Ser

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

secuencia "K5" – la correspondiente región variable está subrayada (SEQ ID NO: 39)

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
Arg Cys

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro

ES 2 654 551 T3

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Glu Ser Gly Val
Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Gln Pro

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe
Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
Pro Pro

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
Phe Tyr

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
Ser Gln

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
Leu Thr

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
Gln Gly

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

secuencia "K12" – la correspondiente región variable está subrayada (SEQ ID NO: 40)

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
Arg Cys

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
Lys Asp

Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val
Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Gln Pro

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe
Gly Gly

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
Pro Pro

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
Phe Tyr

ES 2 654 551 T3

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
Ser Gln

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
Leu Thr

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
Gln Gly

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

secuencia "K15" – la correspondiente región variable está subrayada (SEQ ID NO: 41)

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala
Arg Cys

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val
Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Gln Pro

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe
Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
Pro Pro

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
Phe Tyr

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
Ser Gln

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
Leu Thr

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
Gln Gly

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

secuencia "VH27" – región variable (SEQ ID NO: 42)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Arg Leu Ser

ES 2 654 551 T3

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln
Ala Pro

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala
Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser
Ser Val

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Thr
Arg Val

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

secuencia "VH19" – región variable (SEQ ID NO: 43)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Lys Leu Ser

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln
Ser Pro

Glu Met Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala
Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser
Ser Val

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr
Arg Val

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

secuencia "VK5" – región variable (SEQ ID NO: 44)

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Glu Ser Gly Val
Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Gln Pro

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe
Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

secuencia "VK12" – región variable (SEQ ID NO: 45)

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
Lys Asp

Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val
Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Gln Pro

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe
Gly Gly

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

secuencia "VK15" – región variable (SEQ ID NO: 46)

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
Lys Pro

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val
Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Gln Pro

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe
Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

secuencia de CSF1 humano, 1-444 (SEQ ID NO: 47)

MetThrAlaProGlyAlaAlaGlyArgCysProProThrThrTrpLeuGlySerLeuLeu
LeuLeuValCysLeuLeuAlaSerArgSerIleThrGluGluValSerGluTyrCysSer
HisMetIleGlySerGlyHisLeuGlnSerLeuGlnArgLeuIleAspSerGlnMetGlu

ThrSerCysGlnIleThrPheGluPheValAspGlnGluGlnLeuLysAspProValCys
 TyrLeuLysLysAlaPheLeuLeuValGlnAspIleMetGluAspThrMetArgPheArg
 AspAsnThrProAsnAlaIleAlaIleValGlnLeuGlnGluLeuSerLeuArgLeuLys
 SerCysPheThrLysAspTyrGluGluHisAspLysAlaCysValArgThrPheTyrGlu
 ThrProLeuGlnLeuLeuGluLysValLysAsnValPheAsnGluThrLysAsnLeuLeu
 AspLysAspTrpAsnIlePheSerLysAsnCysAsnAsnSerPheAlaGluCysSerSer
 GlnAspValValThrLysProAspCysAsnCysLeuTyrProLysAlaIleProSerSer
 AspProAlaSerValSerProHisGlnProLeuAlaProSerMetAlaProValAlaGly
 LeuThrTrpGluAspSerGluGlyThrGluGlySerSerLeuLeuProGlyGluGlnPro
 LeuHisThrValAspProGlySerAlaLysGlnAlaProProArgSerThrCysGlnSer
 PheGluProProGluThrProValValLysAspSerThrIleGlyGlySerProGlnPro
 ArgProSerValGlyAlaPheAsnProGlyMetGluAspIleLeuAspSerAlaMetGly
 ThrAsnTrpValProGluGluAlaSerGlyGluAlaSerGluIleProValProGlnGly
 ThrGluLeuSerProSerArgProGlyGlyGlySerMetGlnThrGluProAlaArgPro
 SerAsnPheLeuSerAlaSerSerProLeuProAlaSerAlaLysGlyGlnGlnProAla
 AspValThrGlyThrAlaLeuProArgValGlyProValArgProThrGlyGlnAspTrp
 AsnHisThrProGlnLysThrAspHisProSerAlaLeuLeuArgAspProProGluPro
 GlySerProArgIleSerSerLeuArgProGlnGlyLeuSerAsnProSerThrLeuSer
 AlaGlnProGlnLeuSerArgSerHisSerSerGlySerValLeuProLeuGlyGluLeu
 GluGlyArgArg