

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 895**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2009** **PCT/AU2009/001671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010** **WO10071923**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2009** **E 09833923 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018** **EP 2387418**

54 Título: **Tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

22.12.2008 US 139687 P

30.03.2009 US 164491 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2018

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (100.0%)

**Grattan Street
Parkville, Victoria 3052, AU**

72 Inventor/es:

**HAMILTON, JOHN ALLAN y
COOK, ANDREW DAVID**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 895 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del dolor

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/139.687, presentada el 22 de diciembre, 2008, y la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/164.491, presentada el 30 de marzo, 2009.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a un antagonista de GM-CSF para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en el que dicho antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF o un anticuerpo específico para el receptor de GM-CSF, y en el que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico. Según la presente invención, se propone que los antagonistas de GM-CSF son eficaces en el tratamiento del dolor. La presente descripción proporciona animales transgénicos, tales como un ratón con GM-CSF inactivado, útiles para ensayar antagonistas en ciertos modelos de enfermedad.

Antecedentes de la invención

El dolor

El dolor de cualquier tipo es la razón más frecuente para ir a la consulta del médico en EE. UU. e incita a la mitad de los estadounidenses a buscar asistencia médica cada año. Es el principal síntoma de muchos trastornos médicos e interfiere significativamente con la calidad de vida y la actividad general de la persona. El diagnóstico se basa en caracterizar el dolor de diversas formas, según la duración, la intensidad, el tipo (sordo, quemante o punzante), la fuente o la localización en el cuerpo. Habitualmente, el dolor se detiene sin un tratamiento o responde a medidas sencillas, tales como reposo o tomar un analgésico, y entonces se denomina dolor agudo. Pero también puede hacerse intratable y se desarrolla para convertirse en un trastorno denominado dolor crónico, en el que el dolor ya no se considera un síntoma sino una enfermedad en sí misma.

El dolor puede clasificarse según muchos esquemas y circunstancias. Existen dos tipos básicos de dolor: el agudo y el crónico. El dolor agudo aparece durante breves periodos de tiempo y está asociado con trastornos temporales. Sin embargo, siempre es una señal de alarma que indica que algo puede ir mal. El dolor crónico es continuo y recurrente. Está asociado con enfermedades crónicas y es uno de sus síntomas. La intensidad del dolor no solo depende del tipo de estímulo que lo causa, sino también de la percepción subjetiva del dolor. A pesar de la amplia gama de percepciones subjetivas, se han clasificado varios tipos de dolor según:

- el estímulo que provoca el dolor,
- la duración del dolor,
- las características del dolor (intensidad, localización, etc.).

Otro sistema de clasificación es el siguiente:

- Dolor persistente: Continuo con intensidad constante. En general empeora con el movimiento.
- Dolor pulsante: Es típico del dolor de migraña. Está provocado por la dilatación y la constricción de los vasos sanguíneos cerebrales.
- Dolor punzante: Intenso y grave. Está provocado por estímulos mecánicos.
- Dolor quemante: Una sensación de quemazón constante como, por ejemplo, el tipo de dolor provocado por ardores.
- Dolor de presión: Provocado por la constricción de los vasos sanguíneos o los músculos.

También existen tipos específicos de dolor:

- Dolor muscular: También denominado mialgia, este dolor implica a los músculos y se produce después de un ejercicio excesivo o durante la inflamación.
- Dolor de cólico: Provocado por contracciones de los músculos de ciertos órganos, tales como el útero durante el periodo menstrual. En general tiene una naturaleza cíclica.
- Dolor reflejo: Aparece cuando la sensación dolorosa se siente en un sitio distinto al sitio en que en realidad se está produciendo, depende de cómo interpreta el cerebro la información que recibe del cuerpo.
- Dolor postquirúrgico o postoperatorio: Aparece tras una cirugía y es debido a lesiones resultantes de procedimientos quirúrgicos.

- Dolor de cáncer óseo: Ciertos tipos de cánceres, tales como de próstata, mama u otros tumores de tejidos blandos, pueden avanzar hasta un trastorno doloroso del hueso conocido como enfermedad metastásica ósea.

Los documentos WO2006/122797 y US2009/0053213, MorphoSys AG., Steidl, S. *et al.*, describen regiones de unión a antígenos recombinantes, anticuerpos y sus fragmentos funcionales que son específicos para GM-CSF, por ejemplo, MOR04357, que representan un anticuerpo que tiene una región pesada variable que se corresponde con SEQ ID NO:10 o 48 (ADN)/SEQ ID NO:20 (proteína), y una región ligera variable que se corresponde con SEQ ID NO:30 o 57 (ADN)/SEQ ID NO:40 (proteína). En consecuencia, estos anticuerpos pueden utilizarse para tratar, por ejemplo, enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide.

El documento US 7.455.836, Hamilton *et al.*, describe métodos para el tratamiento y la profilaxis de trastornos inflamatorios. Los métodos se basan en parte en la identificación de células del linaje de monocitos/macrófagos que son fundamentales para la inflamación y, en particular, la inflamación crónica. El documento US 7.455.836 describe además un método para mejorar los efectos de la inflamación crónica en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo específico para GM-CSF al sujeto, durante un tiempo y en una cantidad para inhibir o antagonizar de otro modo los efectos del GM-CSF sobre las células del linaje de monocitos o macrófagos.

El documento WO2002/100387, A+ Science Invest AB, describe el uso de una sustancia antiangiogénica para la producción de una preparación farmacéutica para la prevención de la neovascularización y/o la neoinervación de discos intervertebrales y/o de tejidos con inflamación local, en particular para la prevención del dolor crónico, tal como el dolor lumbar crónico y el trastorno asociado al dolor cervical crónico.

El documento US2007/0243225, McKay, W.F., describe nuevos diseños de implantes de liberación lenta ("depot") de fármacos para el transporte óptimo de agentes terapéuticos a sujetos. La descripción proporciona un método para aliviar el dolor asociado con la inflamación o lesiones neuromusculares o esqueléticas mediante el transporte dirigido de uno o más agentes terapéuticos para inhibir la respuesta inflamatoria que, en último término, provoca dolor agudo o crónico.

Asistencia convencional para el tratamiento del dolor

Existen muchas formas de tratar el dolor. El tratamiento varía dependiendo de la causa del dolor. Las principales opciones de tratamiento son las siguientes:

Acetaminofeno: Se emplea el Tylenol (acetaminofeno) para tratar el dolor. A diferencia de varias otras medicaciones para el dolor, el Tylenol no tiene efectos antiinflamatorios. Sin embargo, en casos de dolor crónico a menudo no se produce inflamación en el sitio del dolor y, por tanto, el Tylenol puede ser una elección de tratamiento apropiada. El Tylenol es seguro cuando se emplea de modo apropiado, pero puede ser peligroso si se emplea en exceso. Además, el Tylenol puede provocar efectos no deseados cuando se usa con otros medicamentos.

Medicaciones antiinflamatorias no esteroideas ("Non-Steroidal Anti-Inflammatory Medications", NSAID): Los NSAID (tal como ibuprofeno, motrina, aleve, etc.) son muy beneficiosos en los casos de dolor agudo, o recrudecimiento en pacientes con dolor crónico. Los NSAID también resultan excelentes para tratar trastornos inflamatorios, que incluyen tendinitis, bursitis y artritis. En general, el uso de los NSAID está limitado en pacientes con dolor crónico, debido al miedo de que se desarrollen problemas estomacales. Aunque se han diseñado los denominados inhibidores de COX-2, más novedosos, tales como Celebrex, para evitar esta complicación, sigue siendo necesaria cierta precaución cuando se emplean estos medicamentos durante largos periodos de tiempo.

Corticosteroides: Al igual que los NSAID, los corticosteroides son poderosas medicaciones antiinflamatorias y se emplean mejor para el dolor agudo o para recrudecimientos de un problema inflamatorio crónico. Los corticosteroides pueden ser administrados por vía oral (tal como Medrol, Prednisona), o pueden ser inyectados en tejidos blandos o articulaciones (inyecciones de cortisona).

Narcóticos: Debe considerarse el uso de narcóticos si el dolor no puede controlarse de otro modo. Muchos narcóticos pueden ser peligrosos y adictivos. Aunque las medicaciones con narcóticos son útiles para el dolor agudo, también presentan unos efectos secundarios significativos. Los tipos de acción a corto plazo de estas medicaciones pueden conducir a un abuso y al desarrollo de tolerancia. Las opciones a largo plazo tienen menos efectos secundarios y controlan mejor el dolor crónico. Los narcóticos pueden ser adictivos si se emplean durante largos periodos de tiempo sin una reducción gradual en la dosis o si las medicaciones se toman por razones distintas al dolor.

Anticonvulsivos: Las medicaciones anticonvulsivas entran en la categoría de las medicaciones que actúan para aliviar el dolor nervioso. Estas medicaciones alteran la función del nervio y las señales que se envían al cerebro. La medicación anticonvulsiva que se receta más a menudo para el dolor nervioso se denomina Neurontin (gabapentina). Otra opción que ha emergido en fechas más recientes, específicamente para el tratamiento de la fibromialgia, se denomina Lyrica (pregabalina).

Anestésicos locales: Los anestésicos locales pueden proporcionar un alivio temporal del dolor en un área. Cuando se emplean al comienzo del dolor crónico, los anestésicos locales a menudo se aplican como un parche tópico al

área del dolor. Lidoderm es un parche que se aplica a la piel y disminuye la sensibilidad de esa área.

Todas las opciones de tratamiento mencionadas anteriormente tienen inconvenientes, efectos secundarios, o su uso se limita a ciertos tipos de dolor. Por tanto, sigue siendo muy necesario, desde el punto de vista médico, un tratamiento del dolor.

5 GM-CSF

El factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) es una citoquina que actúa como factor de crecimiento de leucocitos. El GM-CSF estimula a células pluripotenciales para que produzcan granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos. Los monocitos salen de la circulación y migran hacia tejidos, tras lo cual maduran para formar macrófagos. Por tanto, forma parte de la cascada inmunológica/inflamatoria natural, mediante la cual la activación de un pequeño número de macrófagos puede conducir rápidamente a un aumento en su número, un proceso fundamental para luchar contra una infección. La forma activa del GM-CSF se encuentra extracelularmente como un homodímero. En particular, se ha identificado al GM-CSF como un mediador inflamatorio en trastornos autoinmunitarios, tales como artritis reumatoide (AR), que conduce a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y proteasas y, con ello, en último término a la destrucción articular.

El GM-CSF es una citoquina que está implicada en diversos procesos en el cuerpo de seres humanos y animales. Además, ciertas enfermedades y patologías, tales como enfermedades inflamatorias, se han relacionado en fechas recientes con el GM-CSF, y se ha sugerido que el GM-CSF sea un punto de intervención potencial. La presente invención indica, por primera vez, que el GM-CSF también es una diana válida para el tratamiento del dolor.

Sumario de la invención

La presente invención demuestra, por primera vez, que el GM-CSF es una diana válida para el tratamiento del dolor, en el que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico. Este descubrimiento es nuevo y la técnica anterior no indica, sugiere ni proporciona ningún fundamento para dicho punto de intervención en el tratamiento del dolor. Por consiguiente, la invención proporciona, por ejemplo, un antagonista de GM-CSF para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en el que dicho antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF o un anticuerpo específico para el receptor de GM-CSF, y en el que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico.

En otro aspecto, la presente descripción contempla un método para la profilaxis del dolor en un sujeto, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad eficaz de un antagonista de GM-CSF a dicho sujeto.

En otro aspecto, la presente descripción se dirige a una composición que comprende un antagonista de GM-CSF capaz de antagonizar la capacidad de GM-CSF para activar, hacer proliferar, inducir el crecimiento y/o la supervivencia de células en un sujeto que padece dolor, o que es sospechoso de padecer dolor, y dicha composición comprende además uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a una composición que comprende un antagonista de GM-CSF para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en la que el antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:4, y en la que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico, y en la que dicha composición comprende además uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

En aspectos particulares de la presente invención, el antagonista de GM-CSF es un anticuerpo específico para GM-CSF.

En aspectos alternativos de la presente invención, el antagonista de GM-CSF es un anticuerpo específico para el receptor de GM-CSF.

En otros aspectos, la presente descripción se dirige al uso de un antagonista de GM-CSF en la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor.

En aspectos particulares de la presente invención, dicho dolor es un dolor postquirúrgico. En aspectos alternativos de la presente invención, dicho dolor es dolor de cáncer óseo. En otros aspectos alternativos de la presente invención, los antagonistas de GM-CSF tienen un efecto analgésico.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un mamífero genéticamente modificado que tiene un genotipo GM-CSF Δ -. En aspectos particulares, dicho mamífero es un ratón.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos "comprende", "tiene" e "incluye" y sus respectivas variaciones, tales como "comprendiendo", "teniendo" e "incluyendo", implican la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros mencionados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupos de elementos o de números enteros.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la puntuación de histología de una articulación de rodilla del tratamiento terapéutico con un anticuerpo de GM-CSF en un modelo de ratón de OA. Lat. = lateral. Med. = medial. Los resultados se expresan como promedio $\pm$ PEE. Para todas las áreas, excepto el fémur medial, se observó menos enfermedad en los ratones tratados con el anticuerpo anti-GM-CSF comparado con los ratones control.

La figura 2 muestra el resultado de un experimento que evalúa la distribución de peso en la pata trasera con un medidor de incapacidad. Los datos son significativos (ensayo de la t desapareado) desde el día 27 tras la inducción de OA en adelante, según se indica en la gráfica.

La figura 3 muestra el resultado de un experimento que demuestra la eficacia de los antagonistas de GM-CSF en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria (artritis monoarticular inducida por mBSA/IL1). Se muestran las puntuaciones clínicas de articulaciones de rodilla en el día 7 después del tratamiento. Las barras negras muestran los resultados registrados para los ratones C57BL/6, y las barras blancas muestran los resultados de los ratones con GM-CSF inactivado. Izquierda: ratones tratados con indometacina. Derecha: ratones que no recibieron tratamiento con indometacina.

La figura 4 muestra el resultado de un experimento que demuestra la eficacia de los antagonistas de GM-CSF en el tratamiento del dolor inflamatorio (artritis monoarticular inducida por mBSA/IL1). Se muestra la distribución de peso medida en un medidor de incapacidad como una medida del dolor en ratones con artritis monoarticular inducida por mBSA/IL-1. Los resultados se expresan como pata inyectada/pata control * 100.

La figura 5 muestra el resultado de un experimento que demuestra la eficacia de los antagonistas de GM-CSF en el tratamiento del dolor inflamatorio. Se muestra el nivel de inflamación, medido mediante el cambio en el grosor de la pata después de la inyección de CFA en la almohadilla plantar izquierda (L). La almohadilla plantar derecha (R) es normal. El grupo de "+ indometacina" se trató con indometacina (1 mg/kg) i.p. 1 hr antes de cada lectura. N = 12 ratones/grupo.

La figura 6 muestra el resultado de un experimento que demuestra la eficacia de los antagonistas de GM-CSF en el tratamiento del dolor inflamatorio. Se muestra la distribución de peso medida en un medidor de incapacidad como una medida del dolor después de la inyección de CFA en la almohadilla plantar izquierda. La almohadilla plantar derecha es normal. El grupo de "+ indometacina" se trató con indometacina (1 mg/kg) i.p. 1 hr antes de cada lectura. Los resultados se expresan como pata inyectada/pata control x 100. N = 12 ratones/grupo.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción demuestra que el GM-CSF es una diana válida para el tratamiento del dolor. A este respecto, la invención proporciona, en un aspecto, métodos para emplear un antagonista de GM-CSF para obtener un beneficio profiláctico o terapéutico en el campo del dolor.

La presente descripción proporciona métodos terapéuticos que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de GM-CSF a un sujeto que necesita dicho tratamiento. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz", tal como se emplea en la presente, se refiere a la cantidad de un antagonista de GM-CSF necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. Según la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad de un antagonista de GM-CSF necesaria para tratar y/o prevenir el dolor.

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un método para el tratamiento del dolor postquirúrgico. En otros aspectos, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del dolor de cáncer óseo. En otros aspectos, la presente invención proporciona antagonistas de GM-CSF que tienen un efecto analgésico. En otros aspectos, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento del dolor de artritis reumatoide. Los antagonistas de GM-CSF son capaces de inhibir o bloquear el dolor asociado con la artritis reumatoide. En otros aspectos, la descripción proporciona métodos para reducir la incidencia del dolor de artritis reumatoide, para mejorar el dolor de artritis reumatoide, para suprimir el dolor de artritis reumatoide, para paliar el dolor de artritis reumatoide y/o para retrasar la aparición, el desarrollo o el avance del dolor de artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de un antagonista de GM-CSF al sujeto. En otros aspectos, la presente descripción proporciona un método para prevenir o tratar el dolor de osteoartritis en un individuo mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de GM-CSF al individuo. En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para tratar la caquexia inflamatoria (pérdida de peso) asociada con la artritis reumatoide en un individuo, que comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de GM-CSF. En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para reducir la incidencia del dolor de osteoartritis, para mejorar el dolor de osteoartritis, para suprimir el dolor de osteoartritis, para paliar el dolor de osteoartritis y/o para retrasar la aparición, el desarrollo o el avance del dolor de osteoartritis en un individuo, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de un antagonista de GM-CSF al individuo.

"Paliar" un dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor de artritis reumatoide o dolor de osteoartritis) significa disminuir el grado de una o más manifestaciones clínicas indeseables del dolor postquirúrgico en un

individuo o una población de individuos tratados con un antagonista de GM-CSF según la invención.

En ciertos aspectos, el dolor se alivia dentro de aproximadamente 24 horas después de administrar el antagonista de GM-CSF. En otros aspectos, el dolor se alivia dentro de aproximadamente 4 días después de administrar el antagonista de GM-CSF.

- 5 Los "antagonistas de GM-CSF", tal como se emplean en la presente, incluyen antagonistas de GM-CSF en su sentido más amplio, e incluyen cualquier molécula que inhibe la actividad o la función del GM-CSF o que, de cualquier otra forma, ejerce un efecto terapéutico sobre el GM-CSF. La expresión antagonistas de GM-CSF incluye, pero no se limita a anticuerpos que se unen específicamente a GM-CSF, ácidos nucleicos inhibidores específicos para GM-CSF, o moléculas orgánicas pequeñas específicas para GM-CSF. También se incluyen en el significado de la expresión antagonistas de GM-CSF los anticuerpos que se unen específicamente al receptor de GM-CSF, los ácidos nucleicos inhibidores específicos para el receptor de GM-CSF, o las moléculas orgánicas pequeñas específicas para el receptor de GM-CSF.

- 10 Los ácidos nucleicos inhibidores incluyen, pero no se limitan a ADN antisentido, oligonucleótidos que forman tríplex, secuencias guía externas, ARNip y microARN. Los ácidos nucleicos inhibidores útiles incluyen los que reducen la expresión del ARN que codifica GM-CSF en al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% comparado con controles. Los ácidos nucleicos inhibidores y los métodos para su producción son muy conocidos en la técnica. Están disponibles programas informáticos para el diseño de ARNip.

- 15 Las moléculas orgánicas pequeñas ("small organic molecules", SMOL) específicas para GM-CSF o para el receptor de GM-CSF pueden identificarse mediante la selección de productos naturales o la selección de bancos de productos químicos. Generalmente, el peso molecular de las SMOL es menor que 500 Daltons, más generalmente de 160 a 480 Daltons. Otras propiedades típicas de las SMOL son una o más de las siguientes:

- El coeficiente de reparto log P está en el intervalo de -0,4 a +5,6.

- La refractividad molar es de 40 a 130.

- El número de átomos es de 20 a 70.

- 25 Para un análisis, véase Ghose *et al.*, J. Combin. Chem., 1:55-68, 1999; y Lipinski *et al.*, Adv. Drug Del. Rev., 23:3-25, 1997.

- Preferiblemente, un antagonista de GM-CSF para su uso en la presente invención es un anticuerpo específico para GM-CSF o específico para el receptor de GM-CSF. Este anticuerpo puede ser de cualquier tipo, tal como un anticuerpo murino, de rata, quimérico, humanizado o humano. Un anticuerpo "humano" o un fragmento de anticuerpo humano funcional se define en la presente como un anticuerpo que no es quimérico (por ejemplo, no está "humanizado") y que no procede (todo él o parte) de una especie no humana. Un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo funcional puede obtenerse de un ser humano o puede ser un anticuerpo humano sintético. Un "anticuerpo humano sintético" se define en la presente como un anticuerpo que tiene una secuencia que se obtiene, toda ella o parte, por medios informáticos a partir de secuencias sintéticas que se basan en el análisis de secuencias de anticuerpos humanos conocidas. El diseño por medios informáticos de una secuencia de anticuerpo humano, o uno de sus fragmentos, puede lograrse, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos humanos y diseñando una secuencia polipeptídica utilizando los datos obtenidos. Otro ejemplo de un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo funcional es uno codificado por un ácido nucleico aislado de un banco de secuencias de anticuerpos de origen humano (es decir, dicho banco se basa en anticuerpos obtenidos de una fuente natural humana).

- Un "anticuerpo humanizado" o un fragmento de anticuerpo humanizado funcional se define en la presente como uno que (i) se deriva de una fuente no humana (por ejemplo, un ratón transgénico que porta un sistema inmunológico heterólogo), y dicho anticuerpo se basa en una secuencia de línea germinal humana; o (ii) es quimérico, en el que el dominio variable se deriva de un origen no humano y el dominio constante se deriva de un origen humano; o (iii) tiene CDR injertadas, en el que las CDR del dominio variable tienen un origen no humano, mientras que uno o más marcos del dominio variable son de origen humano y el dominio constante (si está presente) es de origen humano.

- La expresión "anticuerpo quimérico" o un fragmento de anticuerpo quimérico funcional se define en la presente como una molécula de anticuerpo que tiene regiones constantes de anticuerpo derivadas de secuencias o correspondientes a secuencias que se encuentran en una especie, y regiones variables de anticuerpo que se derivan de otra especie. Preferiblemente, las regiones constantes de anticuerpo se derivan o se corresponden con secuencias que se encuentran en seres humanos, por ejemplo, en la línea germinal o en células somáticas humanas, y las regiones variables de anticuerpo (por ejemplo, regiones VH, VL, CDR o FR) se derivan de secuencias que se encuentran en un animal no humano, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo o un hámster.

- 55 Tal como se emplea en la presente, un anticuerpo "se une específicamente", es "específico para" o "reconoce específicamente" un antígeno (en la presente, GM-CSF o, como alternativa, el receptor de GM-CSF) si dicho anticuerpo es capaz de discriminar entre dicho antígeno y uno o más antígenos de referencia, puesto que la

especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino relativa. El antígeno o antígenos de referencia pueden ser uno o más antígenos muy relacionados, que se emplean como puntos de referencia, por ejemplo, IL3, IL5, IL-4, IL13 o M-CSF. En su forma más general (y cuando no se menciona una referencia definida), la "unión específica" se refiere a la capacidad del anticuerpo para discriminar entre el antígeno de interés y un antígeno no relacionado, según se determina, por ejemplo, según uno de los siguientes métodos. Dichos métodos comprenden, pero no se limitan a transferencias Western, ensayos ELISA, RIA, ECL, IRMA y barridos de péptidos. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo ELISA convencional. La puntuación puede realizarse mediante el desarrollo de un color patrón (por ejemplo, un anticuerpo secundario con peróxido de rábano y tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno). La reacción en ciertos pocillos se puntúa mediante la densidad óptica, por ejemplo, a 450 nm. El fondo típico (= reacción negativa) puede ser de 0,1 DO; la reacción positiva típica puede ser de 1 DO. Esto significa que la diferencia entre positiva/negativa puede ser mayor en más de 10 veces. Generalmente, la determinación de la especificidad de unión no se realiza empleando un único antígeno de referencia, sino un conjunto de aproximadamente tres a cinco antígenos no relacionados, tales como leche en polvo, BSA, transferrina o similares. Además, la "unión específica" puede relacionarse con la capacidad de un anticuerpo para discriminar entre diferentes partes de su antígeno diana, por ejemplo, diferentes dominios o regiones del GM-CSF o del receptor de GM-CSF, o entre uno o más restos aminoácidos clave o tramos de restos aminoácidos de GM-CSF o del receptor de GM-CSF.

Tal como se emplea en la presente, una "inmunoglobulina" (Ig) se define en la presente como una proteína que pertenece a la clase IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD (o cualquiera de sus subclases), e incluyen todos los anticuerpos conocidos de modo convencional y sus fragmentos funcionales. Un "fragmento funcional" de un anticuerpo/inmunoglobulina se define en la presente como un fragmento de un anticuerpo/inmunoglobulina (por ejemplo, una región de una IgG) que conserva la región de unión al antígeno. Una "región de unión al antígeno" de un anticuerpo generalmente se encuentra en una o más regiones hipervariables de un anticuerpo, es decir, las regiones CDR-1, -2 y/o -3; sin embargo, las regiones "de marco" variables también pueden desempeñar un papel importante en la unión al antígeno, tal como proporcionando un andamiaje para las CDR. Preferiblemente, la "región de unión al antígeno" comprende al menos 4 a 103 restos aminoácidos de la cadena ligera variable (VL), y de 5 a 109 de la cadena pesada variable (VH), más preferiblemente de 3 a 107 restos aminoácidos de VL y de 4 a 111 de VH, y en particular se prefiere las cadenas VL y VH completas (posiciones de aminoácidos 1 a 109 de VL, y 1 a 113 de VH; numeración según el documento WO 97/08320). Una clase de inmunoglobulinas preferidas para su uso en la presente invención es IgG. Los "fragmentos funcionales" de la descripción incluyen el dominio de un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab, scFv o construcciones que comprende dominios variables únicos de inmunoglobulina o dominios únicos de polipéptidos de anticuerpo, por ejemplo, dominios variables únicos de cadena pesada o dominios variables únicos de cadena ligera. El F(ab')₂ o Fab puede modificarse para minimizar o eliminar completamente las interacciones disulfuro intermoleculares que aparecen entre los dominios C_{H1} y C_L.

Un anticuerpo de la invención puede derivarse de un banco de anticuerpos recombinantes que se basa en secuencias de aminoácidos que han sido diseñadas por medios informáticos y son codificadas por ácidos nucleicos que se crean de modo sintético. El diseño por medios informáticos de una secuencia de anticuerpo se logra, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias humanas y diseñando una secuencia polipeptídica utilizando los datos obtenidos. Los métodos para diseñar y obtener secuencias creadas por medios informáticos se describen, por ejemplo, en Knappik *et al.*, J. Mol. Biol., 296:57, 2000; Krebs *et al.*, J. Immunol. Methods., 254:67, 2001; Rothe *et al.*, J. Mol. Biol., 376:1182, 2008; y la patente de EE. UU. n.º 6.300.064 otorgada a Knappik *et al.*, 2000, *supra*.

Puede emplearse cualquier anticuerpo específico para GM-CSF con la presente invención. Se describen ejemplos de anticuerpos en el documento US 11/914.599. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:1, o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:2. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que se derivan de anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:1, o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:2. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen la misma especificidad y/o se unen al mismo epítipo que anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:1, o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:2. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que es al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% homóloga con la secuencia indicada en SEQ ID NO:1. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera que es al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% homóloga con la secuencia indicada en SEQ ID NO:2.

SEQ ID NO.1:

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

SEQ ID No.2:

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

Otros ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en la presente invención son anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:3, o una
 5 secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:4. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que se derivan de anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:3, o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:4. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen la misma especificidad y/o se unen al mismo epítopo que anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada
 10 como se indica en SEQ ID NO:3, o una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:4. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que es al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% homóloga con la secuencia

indicada en SEQ ID NO:3. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera que es al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% homóloga con la secuencia indicada en SEQ ID NO:4.

SEQ ID NO. 3: MOR pesada

**QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKYAGGA
TYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLVTVSS**

SEQ ID NO. 4: MOR ligera

**DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ**

5 Otros ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en la presente invención son anticuerpos que comprenden una secuencia de H-CDR3 seleccionada de:

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp
1 5 10

(SEQ ID NO. 5),

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro
1 5 10

(SEQ ID NO. 6),

Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

(SEQ ID NO. 7),

Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

(SEQ ID NO. 8),

Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro
1 5 10

(SEQ ID NO. 9),

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp
1 5 10

(SEQ ID NO. 10),

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser
1 5 10

(SEQ ID NO. 11),

Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr
1 5 10

(SEQ ID NO. 12),

Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

(SEQ ID NO. 13),

Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn
1 5 10

(SEQ ID NO. 14),

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro
1 5 10

(SEQ ID NO. 15),

y

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

(SEQ ID NO. 16).

Preferiblemente, los anticuerpos que comprenden una secuencia de H-CDR3 seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO:5-16 comprenden además la siguiente secuencia de H-CDR1:

Asp Tyr Leu Leu His
1 5

(SEQ ID NO. 17),

y/o la siguiente secuencia de H-CDR2:

Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

(SEQ ID NO. 18),

5 y/o la siguiente secuencia de L-CDR1:

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn
1 5 10

(SEQ ID NO. 19),

y/o la siguiente secuencia de L-CDR2:

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

(SEQ ID NO. 20),

y/o la siguiente secuencia de L-CDR3:

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr
1 5

(SEQ ID NO.

21).

Otros ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en la presente invención son anticuerpos que comprenden la siguiente secuencia de L-CDR1:

Arg Ala Ser His Arg Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

(SEQ ID NO. 22),

y/o la siguiente secuencia de L-CDR2:

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5 (SEQ ID NO. 23),

y/o la siguiente secuencia de L-CDR3:

Gln Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Val Thr
 1 5 (SEQ ID NO. 24),

y/o la siguiente secuencia de H-CDR1:

Gly Tyr Ile Phe Pro Thr Phe Ala Leu His
 1 5 10

(SEQ ID NO. 25),

y/o la siguiente secuencia de H-CDR2:

Ser Ile Asn Thr Ala Ser Gly Lys Thr Lys Phe Ser Thr Lys Phe Gln
 1 5 10 15

(SEQ ID NO. 26),

5 y/o la siguiente secuencia de H-CDR3:

Asp Arg Phe Gln Asn Ile Met Ala Thr Ile Leu Asp Val
 1 5 10

(SEQ ID NO. 27).

Preferiblemente, dicho anticuerpo comprende todas las CRD de SEQ ID NO:22-27.

El receptor de GM-CSF es un miembro de la superfamilia de receptores de hematopoyetina. Es un heterodímero, que consiste en una subunidad alfa y una subunidad beta. La subunidad alfa es muy específica para GM-CSF, mientras que la subunidad beta es compartida con otros receptores de citoquinas, que incluyen IL3 e IL5. Esto se refleja en la más amplia distribución tisular de la subunidad beta del receptor. La subunidad alfa, GM-CSFR α , se expresa principalmente sobre células mieloides y células no hematopoyéticas, tales como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, células endoteliales y células epiteliales respiratorias. La GM-CSFR α de longitud completa es una glicoproteína de membrana de tipo I de 400 aminoácidos que pertenece a la familia de receptores de citoquinas de tipo I y consiste en un péptido señal de 22 aminoácidos (posiciones 1-22), un dominio extracelular de 298 aminoácidos (posiciones 23-320), un dominio transmembrana desde las posiciones 321-345 y un dominio intracelular corto de 55 aminoácidos. El péptido señal se escinde para proporcionar la forma madura de GM-CSFR α como una proteína de 378 aminoácidos. Están disponibles clones de ADNc de GM-CSFR α humana y murina y, a nivel de proteína, las subunidades del receptor tienen 36% de identidad. El GM-CSF es capaz de unirse con una afinidad relativamente baja a la subunidad α por sí sola (Kd 1-5 nM), pero no se une en absoluto a la subunidad β por sí sola. Sin embargo, la presencia de ambas subunidades α y β produce un complejo de ligando-receptor de alta afinidad (Kd $\gg$ 100 pM). La señalización de GM-CSF se produce a través de su unión inicial a la cadena de GM-CSFR α y después se entrecruza con una subunidad más grande, la cadena β común, para generar la interacción de alta afinidad, que fosforila la vía de JAK-STAT.

Puede emplearse cualquier anticuerpo específico para GM-CSF con la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una secuencia de H-CDR3 mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO:28-46. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que se derivan de anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una secuencia de H-CDR3 mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO:28-46. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen la misma especificidad y/o se unen al mismo epítopo que anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una

secuencia de H-CDR3 mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO:28-46. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de H-CDR3 que es al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95% homóloga con la secuencia de H-CDR3 mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO:28-46.

SEQ ID NO:28:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Ile	Ala	Tyr	Arg	Pro
				5					10	

SEQ ID NO:29:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Arg	Pro
				5					10	

SEQ ID NO:30:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Pro	Thr	Tyr	Gly	Tyr
				5					10	

SEQ ID NO:31:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Pro
				5					10	

SEQ ID NO:32:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu
				5					10	

SEQ ID NO:33:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Val	Tyr	Gly	Leu
				5					10	

SEQ ID NO:34:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro
				5					10	

SEQ ID NO:35:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
5 10

SEQ ID NO:36:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro
5 10

SEQ ID NO:37:

Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu
5 10

SEQ ID NO:38:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
5 10

SEQ ID NO:39:

Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
5 10

SEQ ID NO:40:

Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr
5 10

SEQ ID NO:41:

Ala	Gly	Ser	Ile	Pro	Gly	Trp	Ala	Phe	Asp	Tyr
				5					10	

SEQ ID NO:42:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Leu	Thr	Met	Gly	Leu
				5					10	

SEQ ID NO:43:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Leu	Thr	Met	Gly	Leu
				5					10	

SEQ ID NO:44:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	His	Leu
				5					10	

SEQ ID NO:45:

Val	Gly	Ser	Val	Ser	Arg	Ile	Thr	Tyr	Gly	Phe
				5					10	

SEQ ID NO:46:

Val	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu
				5					10	

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona un antagonista de GM-CSF para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en el que dicho antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF o un anticuerpo específico para el receptor de GM-CSF, y en el que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico. Un "sujeto", tal como se emplea en este contexto, se refiere a cualquier mamífero, incluyendo roedores, tales como ratones o ratas, y primates, tales como macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*), mono rhesus (*Macaca mulatta*) o seres humanos (*Homo sapiens*). Preferiblemente, el sujeto es un primate, lo más preferiblemente un ser humano.

En cierto aspecto, la presente descripción proporciona una composición que comprende un antagonista de GM-CSF capaz de antagonizar la capacidad del GM-CSF para activar, hacer proliferar, inducir el crecimiento y/o la supervivencia de células en un sujeto que padece dolor, o que es sospechoso de padecer dolor, y dicha composición comprende además uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Los anticuerpos anti-GM-CSF de la presente invención pueden antagonizar cualquiera de los papeles del GM-CSF en el dolor.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para la profilaxis del dolor en un sujeto,

comprendiendo dicho método administrar un antagonista de GM-CSF a dicho sujeto. La "profilaxis", tal como se emplea en este contexto, se refiere a métodos que se dirigen a prevenir la aparición de una enfermedad o que retrasan la aparición de una enfermedad.

5 En ciertos aspectos, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en la que dicho antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:4, y en la que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico, y en la que dicha composición comprende además uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

10 En otros aspectos, la presente invención proporciona el uso de un antagonista de GM-CSF en la preparación de un medicamento para el tratamiento del dolor.

En otros aspectos, la presente invención proporciona antagonistas de GM-CSF para el tratamiento del dolor.

15 Las composiciones de la invención son preferiblemente composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista de GM-CSF, en las que dicho antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:4, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento del dolor, en el que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico. Dichos vehículos, diluyentes y excipientes son muy conocidos en la técnica, y los expertos en la técnica encontrarán la formulación y la vía de administración más adecuada para tratar a un sujeto con los antagonistas de GM-CSF de la presente invención.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un mamífero genéticamente modificado que tiene un genotipo GM-CSF $-/-$. En aspectos particulares, dicho mamífero es un ratón. Las expresiones ratón (o mamífero) "inactivado", ratón (o mamífero) "con alteraciones" en ciertos genes, y ratón (o mamífero) con un "genotipo $-/-$ " se emplean de modo intercambiable en la presente invención y son reconocidas por la técnica. Los respectivos animales son deficientes en un respectivo gen, en este caso GM-CSF, en ambos alelos del cromosoma.

25 **Ejemplo 1: Generación de un ratón GM-CSF $-/-$**

La generación de ratones GM-CSF $-/-$ se describe en Stanley *et al.* (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5592. Brevemente, se generaron ratones quiméricos mediante microinyección de células ES derivadas de 129/OLA (H-2b) con un gen GM-CSF alterado en blastocitos hospedantes C57BL/6 (H-2b). Los transmisores de la línea germinal del alelo GM-CSF mutado se cruzaron con ratones C57BL/6 durante 11 generaciones, dando lugar a ratones GM-CSF $+/-$ que se cruzaron endogámicamente para obtener los ratones GM-CSF $-/-$, GM-CSF $+/-$, y GM-CSF $+/+$ utilizados para los experimentos. El estado del genotipo de GM-CSF se determinó mediante análisis con PCR de ADN de la cola. Los animales recibieron pienso para roedores convencional y agua sin límite y se alojaron con los mismos compañeros de camada del mismo sexo en jaulas con un lecho de serrín. Los ratones de ambos sexos se sometieron a los experimentos a la 8 a 15 semanas de edad.

35 **Ejemplo 2: Los antagonistas de GM-CSF son eficaces para tratar el dolor postquirúrgico**

Se emplea un modelo de dolor que imita el dolor postquirúrgico para evaluar la eficacia del tratamiento con antagonistas de GM-CSF.

Animales:

40 Ratas Sprague Dawley macho que pesan entre 220-240 gramos se aclimatan a las instalaciones para animales durante una semana antes de la cirugía.

Cirugía:

45 La cirugía se basa en el procedimiento descrito en Brennan *et al.*, Pain, 64:493- 501, 1996. Los animales se anestesian con isoflurano al 2% en una mezcla con aire que se mantiene durante la cirugía a través de un cono nasal. La superficie plantar de la pata trasera derecha se prepara con una torunda de povidona-yodo y se realiza una incisión longitudinal central de 1 cm a través de la piel y fascia, que comienza a 0,5 cm del borde del talón y se extiende hacia los dedos. Se realizan mediciones con una regla con el pie mantenido en una posición flexionada. El músculo plantar se eleva empleando un fórceps curvado y se realiza una incisión longitudinal. El músculo se corta a través de su grosor total, entre el origen y la inserción. Se controla el sangrado mediante cirugía aplicando presión por medio de una gasa. La herida se cierra con dos suturas de colchonero (monofilamento negro Ethilon 5-0). Estas suturas se anudan 5-6 veces, y el primer nudo se aprieta poco. El sitio de la herida se limpia con una disolución de bacitracina. Se deja que los animales se recuperen y que descansen en jaulas limpias durante dos horas o más antes de empezar los ensayos de comportamiento.

Evaluación del dolor en reposo:

Se emplea una puntuación de dolor acumulada para evaluar el dolor relacionado con la carga de peso. Los animales

se colocan en una rejilla de plástico (abertura: 8 mm²) en jaulas de plástico transparente que están elevadas sobre una plataforma (altura: 45,72 cm (18 pulgadas)) que permite inspeccionar la parte inferior de las patas. Después de un periodo de aclimatación de 20 minutos, se evalúa la carga de peso en una escala de 0 a 2. Se otorga una puntuación de 0 si la pata está blanquecina o está comprimida contra la rejilla, lo cual indica una carga total del peso. Se otorga una puntuación de 1 si la pata es favorecida, con la piel tocando ligeramente la rejilla, sin que esté blanquecina ni aparezcan indentaciones de la piel. Se otorga una puntuación de 2 si la pata se mantiene completamente alejada de la rejilla. Si la pata se retrae, esto se considera un 2 si la rata sigue en reposo. Cada animal se observa durante 1 minuto cada 5 minutos durante minutos. Se emplea la suma de las 6 puntuaciones (0-12) obtenidas durante 1/2 hora para evaluar el dolor en la pata con la incisión. También se calcula la frecuencia de las puntuaciones de 2 y se emplea para evaluar la incidencia de un dolor grave o el encogimiento total de la pata por el animal. Cada animal se ensaya 24 horas antes de la cirugía (línea de base), y a las 2 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la operación. Los resultados de este experimento demuestran que la puntuación de dolor en reposo acumulada observada en animales tratados con antagonistas de GM-CSF se reduce significativamente comparada con los animales control. La carga de peso es una buena correlación con lo dispuesto que está el animal a utilizar la extremidad y, por tanto, es una medida eficaz del alivio del dolor. Preferiblemente, el antagonista de GM-CSF es un anticuerpo específico para GM-CSF o específico para el receptor de GM-CSF. Estos anticuerpos se inyectan por vía intraperitoneal (i.p.) a diversas concentraciones del anticuerpo (por ejemplo, 0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6 y 1 mg por kilogramo de peso del animal) a las 15 horas antes de la incisión. El grupo de control negativo no recibe anticuerpo pero se le inyecta por vía i.p. una disolución salina. Se inyecta fentanilo a 0,01 mg/kg por vía i.p. como control positivo 30 minutos antes de ensayar a las 24 horas después de la cirugía. Cada experimento implica a 8 animales (n = 8 por grupo) para cada condición, y el grupo control consiste en 56 animales. Se realiza la cirugía y se mide una puntuación de dolor acumulada como se describió anteriormente. El dolor en reposo se evalúa 24 horas después de la cirugía.

Los antagonistas de GM-CSF reducen significativamente el dolor en reposo después de la cirugía cuando se administran con una dosificación de 0,02 mg/kg a 1 mg/kg.

En otro experimento se ensaya la eficacia de los antagonistas de GM-CSF para reducir el dolor postquirúrgico cuando se administran tras la cirugía. Se inyectan anticuerpos específicos de GM-CSF o específicos del receptor de GM-CSF por vía intravenosa (i.v.) dos horas después de la cirugía. El grupo control no recibe anticuerpo pero se le inyecta por vía i.p. una disolución salina. Se realiza la cirugía y se evalúa el dolor en reposo, expresado como una puntuación de dolor acumulada, 24 horas después de la cirugía. El tratamiento con antagonistas de GM-CSF reduce significativamente el dolor en reposo 24 horas después de la incisión cuando el anticuerpo se administra 2 horas después de la incisión. Estos resultados demuestran que los antagonistas de GM-CSF alivian de modo eficaz el dolor postquirúrgico cuando se administran después de una cirugía.

Evaluación de la hiperalgesia térmica:

La hiperalgesia térmica se evalúa mediante el ensayo plantar en ratas (Ugo Basile, Italia) siguiendo un método modificado de Hargreaves *et al.* (1988). Las ratas se habitúan al aparato que consiste en cuatro cajas de plexiglás individuales sobre una mesa de vidrio elevada. Se coloca una fuente de calor radiante móvil bajo la mesa y se enfoca en la pata trasera. Cuando el animal está inmóvil, pero no dormido, se pulsa el botón de la caja control, la fuente de calor radiante se enciende y se registra automáticamente el tiempo que tarda el animal en retirarse de la fuente de calor. Esta latencia de retirada de la pata (POOL) es detectada por un detector de luz que se encuentra dentro de la fuente de calor radiante que detecta el movimiento de la pata trasera mediante un cambio en la reflectancia de la fuente radiante. Se registran las latencias de retirada de la pata ("paw withdrawal latencies", PWL) en segundos. Hay un punto de corte automático a 22,5 s para evitar daños en los tejidos. Se mide la PWL de tres a cuatro veces para ambas patas traseras de cada animal, cuyo promedio representa las líneas de base para las patas traseras izquierda y derecha. Los resultados se presentan como la proporción de puntuación medida en la pata derecha (sitio de la cirugía) y la pata izquierda. El aparato se calibra una vez (al comienzo del estudio) y se ajusta a una intensidad de 40 para que arroje una PWL normal de aproximadamente 6 segundos. Cada animal se ensaya 24 horas antes de la cirugía (línea de base), y a las 3 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la operación. Las mediciones de hiperalgesia térmica se toman después de las mediciones de alodinia táctil. Los resultados demuestran que el tratamiento con antagonistas de GM-CSF reduce significativamente la hiperalgesia térmica postquirúrgica.

Ejemplo 3: Los antagonistas de GM-CSF son eficaces para tratar el dolor de cáncer óseo

Los antagonistas de GM-CSF, tales como anticuerpos específicos de GM-CSF o anticuerpos específicos del receptor de GM-CSF, son eficaces para tratar el dolor de cáncer asociado con la metástasis ósea.

Se emplea un modelo de dolor de cáncer óseo murino para evaluar la eficacia del tratamiento con antagonistas de GM-CSF. Este modelo murino de dolor de cáncer óseo se desarrolla mediante una inyección intramedular de células de sarcoma osteolítico en el fémur del ratón, y el agujero de la aguja después se rellena con amalgama dental para confinar el tumor al hueso (véase Schwei *et al.*, J. Neuroscience, 19:10886-10897, 1999; y Luger *et al.*, Pain, 99:397-406, 2002). Los experimentos se realizan en ratones C3H/HeJ macho adultos. En el día 0 se realiza una artrotomía tras la inducción de una anestesia general con pentobarbital sodio (50 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)). Se inserta una aguja en el canal medular para crear una vía para las células de sarcoma. Después se realiza una depresión

empleando una pieza de mano dental neumática de alta velocidad. Además de los animales no expuestos ($n = 5$), se generaron animales de simulación ($n = 5$) mediante una inyección de medio esencial mínimo (20 μ l, Sigma, St. Louis, MO) al espacio intramedular del fémur (denominados simulación), mientras que los animales de sarcoma ($n = 5$ para cada condición ensayada) fueron inyectados con un medio que contenía 105 2472 células de sarcoma osteolítico (denominados sarcoma o sarc) (20 μ l, ATCC, Rockville, MD). En todos los animales, el sitio de inyección se sella con un tapón de amalgama dental para confinar las células o el medio inyectado al canal intramedular, tras lo cual se irriga con agua estéril (disolución hipotónica). Por último, la incisión se cierra con grapas para heridas. Las grapas se retiran en el día 5 para que no interfieran con el ensayo del comportamiento. Un segundo grupo de animales inyectados con sarcoma se trata con anticuerpos específicos de GM-CSF o específicos del receptor de GM-CSF (por ejemplo, 10 mg/kg, i.p.) en los días 6 y 13.

Análisis del comportamiento:

Los animales se ensayan para los comportamientos relacionados con el dolor en el día 10 y el día 14 tras la implantación del tumor. Se ensaya el comportamiento de los animales empleando los siguientes ensayos: dolor en curso (postura de defensa espontánea y retraimiento), dolor ambulatorio (uso de la pata y noria), y dolor evocado por el movimiento (postura de defensa evocada por palpamiento y retraimiento evocado por palpamiento). Los animales se colocan en una caja de observación de plástico transparente con un suelo de malla de alambre y se deja que se habitúen durante un periodo de 30 min. Después de la aclimatación, se evalúa la postura de defensa espontánea, el retraimiento espontáneo, el uso de la extremidad durante la ambulación normal en campo abierto, y la postura de defensa durante la ambulación forzada. Se mide la postura de defensa y el retraimiento inducidos por palpamiento después del periodo de 2 min de palpamiento normalmente no nocivo del fémur distal en los animales de sarcoma e inyectados con simulación.

Se registra simultáneamente el número de retraimientos espontáneos y el tiempo pasado en postura de defensa, que representan un comportamiento nociceptivo, durante un periodo de observación de 2 min. La postura de defensa se define como el tiempo que se mantiene alzada la pata trasera durante el movimiento ambulatorio, y los retraimientos son el número de veces que el animal alza la pata. El uso normal de la extremidad durante la ambulación espontánea se puntúa en una escala de 5 a 0: (5) uso normal, y (0) falta completa de uso de la extremidad.

La postura de defensa ambulatoria forzada se determina empleando una noria (Columbus Instruments, Columbus, OH). La máquina rotatoria tiene una varilla que da vueltas y está equipada con controles de velocidad, aceleración y sensibilidad. Los animales se colocan sobre la varilla con velocidad de X4, aceleración de 8,0 y sensibilidad de 2,5. La postura de defensa ambulatoria forzada se puntúa en una escala de 5 a 0: (5) uso normal, y (0) falta completa de uso. Después de un palpamiento normalmente no nocivo del fémur distal en los animales cada segundo durante 2 min, los animales se colocan en la caja de observación y se mide la postura de defensa inducida por palpamiento y el retraimiento inducido por palpamiento durante 2 min más.

Tratamiento con antagonistas de GM-CSF:

En el día 6 y el día 13, los animales inyectados con sarcoma se inyectan por vía intraperitoneal (i.p.) con antagonistas de GM-CSF, tales como un anticuerpo anti-GM-CSF o un anticuerpo anti-receptor de GM-CSF ($n = 5$), o los animales inyectados con sarcoma e inyectados con simulación se inyectaron (i.p.) con disolución salina ($n = 5$ para cada condición). Se analizó el comportamiento de todos los animales en los días 10 y 14.

Evaluación de los comportamientos de dolor en curso:

Los animales inyectados con sarcoma (administrados con disolución salina) desarrollan comportamientos de dolor en curso estadísticamente significativos, según se evalúa mediante la postura de defensa espontánea y el retraimiento espontáneo, comparado con los animales inyectados con simulación (administrados con disolución salina).

La administración de antagonistas de GM-CSF reduce significativamente la postura de defensa espontánea y el retraimiento espontáneo en los ratones inyectados con sarcoma en el día 10 y el día 14 tras la implantación del sarcoma, comparado con la administración de disolución salina a los ratones inyectados con sarcoma. Estos resultados indican que los antagonistas de GM-CSF reducen el dolor en curso en ratones inyectados con sarcoma.

Evaluación de los comportamientos de dolor ambulatorio:

Los animales inyectados con sarcoma (administrados con disolución salina) desarrollan comportamientos de dolor ambulatorio, según se evalúa mediante el uso de la extremidad y la postura de defensa durante el movimiento ambulatorio forzado (noria), comparado con los animales inyectados con simulación (administrados con disolución salina). La administración de antagonistas de GM-CSF aumenta significativamente la puntuación del uso de la extremidad y la puntuación de postura de defensa durante el movimiento ambulatorio forzado en el día 10 y el día 14 tras la implantación del sarcoma, comparado con la administración de disolución salina a los ratones inyectados con sarcoma. Estos resultados indican que los antagonistas de GM-CSF reducen el dolor ambulatorio en ratones inyectados con sarcoma.

Evaluación de los comportamientos de dolor evocados por el tacto:

Los animales inyectados con sarcoma (administrados con disolución salina) desarrollan comportamientos de dolor evocado por el tacto, según se evalúa mediante la postura de defensa inducida por palpamiento y el retraimiento inducido por palpamiento, comparado con los animales inyectados con simulación (administrados con disolución salina). La administración de antagonistas de GM-CSF reduce significativamente la postura de defensa inducida por palpamiento y el retraimiento inducido por palpamiento en los ratones inyectados con sarcoma en el día 10 y el día 14 tras la implantación del sarcoma, comparado con la administración de disolución salina a los ratones inyectados con sarcoma. Estos resultados indican que los antagonistas de GM-CSF reducen el dolor evocado por el tacto en ratones inyectados con sarcoma.

10 **Ejemplo 4: Efectos analgésicos de los antagonistas de GM-CSF**

Se investigaron los efectos analgésicos de los antagonistas de GM-CSF en la artritis crónica inducida por adyuvante de Freund (CFA) en ratas empleando el ensayo de vocalización en comparación con la indometacina que se emplea como sustancia de referencia.

15 En este estudio se incluyen cincuenta (50) ratas Lewis macho (LEWIS LEW/Crl lco) que pesan de 150 g a 220 g al comienzo de la fase experimental. Durante al menos 5 días antes del experimento, todos los animales se mantuvieron en una sala con temperatura controlada (19,5-24,5 °C), humedad relativa controlada (al 45-65%) y un ciclo de 12 h de luz/oscuridad con acceso sin límite a agua del grifo filtrada y pienso de laboratorio en gránulos convencional a lo largo del estudio. A los animales se les identificó individualmente en la cola.

20 En el día 0 (D0), se induce la artritis en ratas mediante una inyección intradérmica en la cola de 0,05 ml de una suspensión de *Mycobacterium butyricum* en aceite mineral (10 mg/ml). En el día 14 (D14), las ratas artríticas se incluyen en el estudio según su capacidad para vocalizar tras una flexión suave de la pata trasera y por su índice de artritis, evaluado empleando una puntuación de inflamación para cada pata trasera y delantera (véase, Kuzuna *et al.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokio), 23:1184-1191, 1975; y Pearson *et al.*, Arthritis Rheum., 2:440-459, 1959).

25 Los animales se puntuaron basándose en los siguientes criterios: puntuación 0: aspecto normal; puntuación 1: eritema; puntuación 2: eritema con un ligero edema; puntuación 3: inflamación intensa sin anquilosis; puntuación 4: anquilosis. Solo se incluyeron en el estudio los animales capaces de vocalizar tras una flexión suave y que presentan una puntuación de 2 o 3.

30 En el estudio se incluyen cuatro grupos de 10 ratas cada uno. Para el grupo 1 (vehículo), en el día 14 (D14), después de la selección, a las ratas se les administró por vía intravenosa un vehículo (disolución salina). En el día 18 (D18) se evaluó la intensidad nociceptiva mediante una flexión suave de la pata trasera y se registró la intensidad del nivel de vocalización para cada animal. Para el grupo 2 (4 días), en el D14, después de la selección, a las ratas se les administró por vía intravenosa un anticuerpo específico de GM-CSF. En el día 18 (D18) se evaluó la intensidad nociceptiva mediante una flexión suave de la pata trasera y se registró la intensidad del nivel de vocalización para cada animal. Para el grupo 3 (24 horas), en el día 17 después de la inyección de CFA, a las ratas se les administró por vía intravenosa un anticuerpo específico de GM-CSF o un anticuerpo específico del receptor de GM-CSF. Se evaluó la intensidad nociceptiva mediante una flexión suave de la pata trasera 24 horas después, y se registró la intensidad del nivel de vocalización para cada animal. Para el grupo 4 (indometacina), en el día 18 (D18), se evaluó la intensidad nociceptiva mediante una flexión suave de la pata trasera una hora después de la administración oral de indometacina (10 mg/kg). También se registró la intensidad del nivel de vocalización para cada animal. Las sustancias de ensayo se administran de una manera ciega y aleatoria por vía intravenosa a un volumen de 5 ml/kg, mientras que la indometacina se administró por vía oral en un volumen de 10 ml/kg.

45 Los antagonistas de GM-CSF muestran unos efectos analgésicos significativos. Se determina la significancia estadística entre los grupos tratados y el grupo de vehículo con un ensayo de Dunnett empleando la varianza residual después de un análisis de una vía de la varianza. El anticuerpo específico de GM-CSF y el anticuerpo específico del receptor de GM-CSF reducen significativamente el dolor en un modelo en rata de artritis reumatoide 24 horas o 4 días después de una única administración del anticuerpo.

Ejemplo de referencia 5: Los antagonistas de GM-CSF son eficaces para tratar el dolor osteoartítico

En este experimento se empleó un anticuerpo monoclonal específico para GM-CSF para demostrar que un antagonista de GM-CSF puede ser eficaz para tratar el dolor osteoartítico.

50 Modelo en ratón de OA inducida por colágeno:

Ratones C57BL/6 recibieron 1 unidad de collagenasa de tipo VII de modo intraarticular en la rodilla derecha en los días 0 y 2 para inducir la inestabilidad de la articulación (véase, Blom *et al.* (2004), Osteoarthritis Cartilage, 12, 627-635).

Tratamiento con anticuerpo anti-GM-CSF:

Se dividieron aleatoriamente 20 ratones en 2 grupos (10 ratones/grupo).

Grupo 1 (n = 10): anticuerpo anti-GM-CSF (22E9)

Grupo 2 (n = 10): anticuerpo de control de isotipo IgG2a

5 Los ratones se trataron por vía intraperitoneal tres veces semanales durante 6 semanas con 250 µg/ratón/tratamiento de anticuerpo anti-GM-CSF (22E9) o anticuerpo de control de isotipo IgG2a. El tratamiento comenzó 4 días antes de la inducción de OA (profiláctico), es decir, los ratones se trataron en el día -4, día -2, día 0 (el día de la primera inyección de colagenasa), y después 3 veces semanales hasta el final del experimento a las 6 semanas). En las semanas 2, 4 y 6, los ratones fueron sangrados. Ambos anticuerpo control y anticuerpo anti-GM-CSF fueron purificados para que contuviesen menos de 10 unidades de endotoxina/ml.

10 Se empleó el anticuerpo 22E9 como ejemplo de un anticuerpo anti-GM-CSF. El 22E9, que tiene el isotipo IgG2a, es un anticuerpo de rata específico anti-GM-CSF de ratón. El 22E9 se adquirió en AbD Serotec (Martinsried, Alemania, n.º de catálogo 1023501). Existen suministradores alternativos, por ejemplo, eBioscience (San Diego, CA, EE. UU. n.º de catálogo 14-7331).

Histología:

15 A las 6 semanas después de las inyecciones finales se realizó una histología de las articulaciones de la rodilla de los ratones. Se recolectaron las articulaciones de la rodilla, se fijaron, se descalcificaron, se introdujeron en parafina y se cortaron a 7 µm con un microtomo. Los portaobjetos se tiñeron con safranina-O/verde rápido y hematoxilina y eosina para demostrar la patología de las articulaciones. La patología investigada incluye: daños en el cartílago, sinovitis, formación de osteofitos y deformación de la articulación.

20 El sistema de puntuación empleado para la patología del cartílago fue el siguiente:

Grado

0: Normal

1: Irregular pero intacta

1,5: Irregular con superficie rugosa

25 2: Fibrilación superficial

2,5: Fibrilación superficial con menos células en la capa del cartílago

3: Fisuras verticales

3,5: Fisuras ramificadas y/u horizontales, rupturas en la línea de flujo

4: La pérdida del cartílago no se extiende hasta la línea de flujo

30 4,5: La pérdida de cartílago se extiende hasta la línea de flujo

5: La pérdida del cartílago supera la línea de flujo, pero no se extiende hasta el hueso

5,5: La pérdida de cartílago se extiende hasta el hueso

6: Pérdida de hueso/remodelación/deformación

Estadio

35 1: <10% de área dañada

2: 10-25% de área dañada

3: 25-50% de área dañada

4: 50-75% de área dañada

El grado se multiplicó por el estadio para obtener la puntuación.

40 Este sistema de puntuación se basa en un método reconocido para evaluar la histopatología de la OA en la OA clínica y experimental. Véase, Pritzker *et al.* (2006), Osteoarthritis Cartilage, 14, 13-29. El grado se define como el avance en profundidad de la OA hacia el interior del cartílago. El estadio se define como la extensión horizontal de implicación del cartílago, es decir, qué cantidad de cartílago se ve afectada. El grado se multiplica por el estadio para obtener la puntuación para conseguir una puntuación global para así representar la evaluación combinada de la

gravedad y la extensión de la OA. Se puntúan hasta seis secciones por ratón.

El grado se multiplicó por el estadio para obtener la puntuación.

Se empleó el siguiente sistema de puntuación para la sinovitis (sistema de puntuación de la capa sinovial):

0: Sin cambios comparado con articulaciones normales

- 5 1: Espesamiento del revestimiento sinovial y cierto influjo de células inflamatorias
- 2: Espesamiento del revestimiento sinovial e influjo intermedio de células inflamatorias
- 3: Espesamiento intenso del revestimiento sinovial e influjo máximo observado de células inflamatorias

Mediciones del dolor:

- 10 Un indicador del dolor empleado para modelos de OA es la distribución diferencial de peso medida empleando un medidor de incapacidad. Este instrumento mide los cambios en la distribución de peso entre la pata trasera operada y contralateral no operada. Se dejó que los ratones se aclimatasen al equipo en tres ocasiones antes del experimento. El peso colocado en cada pata trasera se midió a lo largo de un periodo de 5 segundos. Se tomaron tres mediciones diferentes por cada ratón en cada momento del tiempo y después se promediaron. Las mediciones se realizaron 2 veces semanales a lo largo del experimento. Los resultados se expresan como extremidad inyectada con colagenasa/extremidad control x 100.
- 15

Resultados:

Para todas las áreas analizadas en la histología (excepto el fémur medial), es decir, el fémur lateral, la tibia lateral, y la tibia medial, se observó una tendencia evidente hacia menos enfermedad en ratones tratados con anticuerpo anti-GM-CSF. Los resultados se muestran en la figura 1.

- 20 La evaluación de la distribución del peso como una medida del dolor asociado con la artritis muestra un desplazamiento significativo en el peso alejándose de la rodilla artrítica desde el día 27 en adelante en el grupo tratado con el mAb anti-GM-CSF, comparado con grupo tratado con mAb control. Los resultados se muestran en la figura 2.
- 25 Los ratones tratados con un antagonista de GM-CSF muestran menos enfermedad, comparados con los ratones tratados con el anticuerpo control. Los ratones tratados con un antagonista de GM-CSF también mostraron significativamente menos dolor en los estadios tardíos de la enfermedad, comparados con los ratones tratados con el anticuerpo control. Los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo mostraron unas señales significativamente mayores de osteoartritis, comparados con los ratones que recibieron el anticuerpo específico de GM-CSF. Esto demuestra que los antagonistas de GM-CSF son eficaces en el tratamiento del dolor osteoartítico.

30 **Ejemplo de referencia 6: Los antagonistas de GM-CSF son eficaces para tratar el dolor inflamatorio/modelo de mBSA**

- El siguiente experimento demuestra que los antagonistas de GM-CSF también son eficaces en el tratamiento del dolor inflamatorio. Para ello, se indujo una artritis monoarticular con mBSA/IL-1 en ratones con GM-CSF inactivado y en ratones control. El dolor se evaluó con o sin la administración de indometacina, una sustancia que alivia el dolor, en diversos momentos empleando un medidor de la incapacidad.
- 35

Ratones:

Se emplearon 24 ratones C57BL/6 macho y 24 ratones GM-CSF -/- macho (véase el ejemplo 1) en cuatro grupos de tratamiento:

Grupo 1 : GM-CSF KO (n = 12): BSA metilado/IL-1

- 40 Grupo 2: GM-CSF KO (n = 12): mBSA metilado/IL-1 + indometacina

Grupo 3: C57BL/6 de tipo salvaje (n = 12): BSA metilado/IL-1

Grupo 4: C57BL/6 C57BL/6 de tipo salvaje (n = 12): BSA metilado/IL-1 + indometacina

Inducción de la artritis monoarticular:

- La artritis monoarticular se indujo mediante una inyección intraarticular de 10 µl de mBSA (20 mg/ml) en disolución salina en la articulación de la rodilla y 10 µl de disolución salina en la articulación de la rodilla contralateral. Se administraron 20 µl de IL-1β (250 ng) por vía subcutánea a diario durante 3 días. Generalmente, se desarrolla una respuesta entre los días 4 y 7 después de la inyección de mBSA y se resuelve para el día 28. La incapacidad se ensayó en los días 2, 3, 4, 5 y 7.
- 45

La indometacina (Sigma) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo que se emplea habitualmente para reducir la fiebre, el dolor, la rigidez y el hinchamiento. Actúa inhibiendo la producción de prostaglandinas. Se administró 1 mg/kg i.p. de indometacina a los grupos 2 y 4 una hora antes de evaluar el dolor empleando un medidor de capacidad.

5 Lectura del dolor:

Se empleó un medidor de incapacidad (promediador de peso dual) para evaluar de modo automático y reproducible la potencia analgésica midiendo la distribución de peso sobre las dos patas traseras. La fuerza ejercida por cada pata (medida en gramos) se promedia a lo largo de un periodo de tiempo que puede ser seleccionado por el usuario, indicando así cualquier tendencia existente en el animal a desplazar su peso de un lado al otro, proporcionando con ello una medición cuantitativa de la incapacidad.

El peso colocado en cada pata trasera se midió a lo largo de un periodo de 5 segundos. Se tomaron tres mediciones diferentes por cada ratón en cada momento del tiempo y después se promediaron. Los resultados se expresan como pata inyectada/pata control x 100. Así, un valor de 100 significa que se está colocando un peso equivalente en la pata derecha e izquierda. Un valor por debajo de 100 significa que se está colocando menos peso en la pata inyectada (izquierda) comparado con la pata control (derecha).

Resultados:

Este modelo induce sinovitis en la articulación de la rodilla mediante la inyección de mBSA. En el día 7, las articulaciones de la rodilla se examinaron de modo visual y se les adjudicó una puntuación de 0 (normal) a 3 (muy inflamada) (figura 3). La rodilla izquierda, que había sido inyectada con mBSA, estaba significativamente más inflamada comparada con la rodilla derecha (inyectada con disolución salina) ($p > 0,001$ para ratones C57, y $p = 0,02$ para ratones GM-CSF^{-/-}) (figura 3). De hecho, todas las rodillas derechas, que fueron inyectadas con disolución salina, recibieron una puntuación de 0. No se observaron diferencias significativas entre los ratones tratados o no con indometacina en cada una de las razas.

Los ratones C57BL/6 mostraron significativamente más dolor (medido por el desplazamiento en el peso alejándose de la rodilla inyectada con mBSA), comparado con los ratones GM-CSF^{-/-}, cuando se induce una artritis monoarticular con mBSA/IL-1 (figura 4). Esto fue significativo desde el día 4 en adelante.

Los ratones C57BU6 tratados con indometacina muestran significativamente menos dolor, comparado con los ratones no tratados con indometacina tras la inducción de una artritis monoarticular con mBSA/IL-1 (figura 4), de modo que las lecturas fueron similares a los ratones GM-CSF^{-/-}. Puesto que los ratones GM-CSF^{-/-} no tenían dolores, el tratamiento con indometacina no produjo ningún efecto.

Los niveles de significancia fueron los siguientes:

Ratones C57BL/6: tratados con indometacina frente al grupo no tratado (grupo 4 frente al grupo 3): día 4, $p < 0,0001$; día 5, $p < 0,001$; día 7, $p = 0,007$

Ratones GM-CSF^{-/-} frente a ratones C57BU6 (grupo 1 frente al grupo 3): día 4, $p < 0,0001$; día 5, $p < 0,0001$; día 7, $p = 0,022$

Estos resultados indican que los ratones C57BL/6 desarrollan un dolor significativo desde el día 4 en adelante en un modelo de artritis monoarticular con mBSA/IL-1, mientras que los ratones GM-CSF^{-/-} no mostraron ninguna señal significativa de dolor. Por tanto, los antagonistas de GM-CSF son muy eficaces en el tratamiento del dolor inflamatorio.

Ejemplo de referencia 7: Los antagonistas de GM-CSF son eficaces para tratar el dolor inflamatorio/modelo de CFA

El siguiente experimento es otro experimento que demuestra la eficacia de los antagonistas de GM-CSF en el tratamiento del dolor inflamatorio. En este caso, el dolor inflamatorio fue inducido con adyuvante de Freund completo. Al igual que en el experimento 5, el dolor se evaluó con o sin la administración de indometacina, una sustancia que alivia el dolor, en diversos momentos empleando un medidor de la incapacidad.

Ratones:

Se emplearon 12 ratones C57BL/6 macho y 12 ratones GM-CSF^{-/-} macho (véase el ejemplo 1) en cada uno de tres grupos de tratamiento:

Grupo 1: C57BL/6 de tipo salvaje ($n = 12$): CFA

Grupo 2: C57BL/6 de tipo salvaje ($n = 12$): CFA + indometacina

Grupo 3: GM-CSF KO ($n = 12$): CFA

Inducción del dolor inflamatorio:

El adyuvante de Freund completo (CFA) (Sigma) contiene la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada con calor H37Ra, en aceite mineral a una concentración de 1 mg/ml. El CFA se mezcló a fondo agitando en vórtice para asegurarse de que las bacterias muertas por calor se incorporan en la suspensión (Kamala T., Hock immunization: a humane alternative to mouse footpad injections, J. Immunol. Methods, 328:204-214, 2007). Inmediatamente después de agitar en vórtice, el adyuvante se introdujo en una jeringa de vidrio empleando una aguja de calibre 19. Las burbujas se eliminaron cuidadosamente de la jeringa y se retiró la aguja. Se inyectaron a cada ratón por vía subcutánea en la pata trasera derecha (almohadilla plantar) 20 µl de la emulsión de CFA. Se administraron 1 mg/kg i.p. de indometacina (véase el experimento 5) a los ratones del grupo 2 una hora antes de la evaluación del dolor.

Lectura del dolor:

Al igual que en el experimento 5, se empleó un medidor de incapacidad (promediador de peso dual) para evaluar de modo automático y reproducible la potencia analgésica midiendo la distribución de peso sobre las dos patas traseras. El peso colocado en cada pata trasera se midió a lo largo de un periodo de 5 segundos. Se tomaron tres mediciones diferentes por cada ratón en cada momento del tiempo y después se promediaron. Los resultados se expresan como pata inyectada/pata control x 100. Así, un valor de 100 significa que se está colocando un peso equivalente en la pata derecha e izquierda. Un valor por debajo de 100 significa que se está colocando menos peso en la pata inyectada (izquierda) comparado con la pata control (derecha). La incapacidad se ensayó después de 24, 48 y 72 h de la inyección de CFA.

Resultados:

Tras la inyección s.c. de CFA en la almohadilla plantar izquierda, los ratones desarrollaron un hinchamiento en la almohadilla plantar izquierda, con una magnitud similar en los ratones C57BL/6 (grupo 1) y GM-CSF-/- (grupo 3). Los ratones C57BL/6 tratados con indometacina (grupo 2) tampoco mostraron diferencias en el grado de hinchamiento (véase la figura 5). No se produjo hinchamiento en la pata contralateral (derecha) en ninguno de los grupos.

La evaluación de la distribución del peso como una medida del dolor demuestra que los ratones C57BL/6 desarrollan un dolor a lo largo del tiempo que era significativamente mayor que en los ratones GM-CSF-/- a las 48 (p = 0,03) y 72 (p = 0,0009) después de la inyección de CFA (figura 6). De modo sorprendente, los ratones GM-CSF-/- no desarrollaron dolor. El tratamiento de los ratones C57BL/6 con indometacina alivia el dolor, de tal forma que las lecturas no fueron diferentes de las de los ratones GM-CSF-/- (figura 6). A las 72 horas después de la inyección de CFA, los ratones C57BL/6 tratados con indometacina mostraban significativamente menos dolor que los ratones C57BL/6 no tratados con indometacina (p = 0,05).

Resumen de los niveles de significancia:

48 horas:

Grupo 3 frente a grupo 1 - p = 0,03

Grupo 2 frente a grupo 1 - p = 0,09

72 horas:

Grupo 3 frente a grupo 1 - p = 0,0009

Grupo 2 frente a grupo 1 - p = 0,05

El grado de hinchamiento de la almohadilla plantar tras la inyección de CFA no fue diferente en ratones GM-CSF-/- comparado con los ratones C57BL/6. Además, el tratamiento con indometacina de los ratones C57BL/6 no produjo efecto sobre el hinchamiento, lo cual es probable que sea debido al hecho de que se administró solo una hora antes de las lecturas de incapacidad. Así, la mayor parte del hinchamiento ya se había producido antes de administrar la primera inyección de indometacina a las 24 horas.

Por contraste, tras la inyección de CFA, los ratones C57BL/6 desarrollaron un dolor significativo que fue reducido por la indometacina. Por otra parte, los ratones GM-CSF-/- no mostraron ninguna señal de dolor. Por tanto, estos experimentos demuestran, de modo sorprendente, que aunque las almohadillas plantares de todos los ratones se inflaman después de una inyección de CFA, los ratones GM-CSF -/- no muestran ninguna señal de dolor.

Ejemplo 8: Eficacia terapéutica de un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende la SEQ ID NO:1 o 2

Se repiten los ejemplos 2-7, en los que se emplea, como antagonista de GM-CSF, un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:1, o que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:2. Puede emplearse otra especie distinta del ratón, en particular una especie para la cual el anticuerpo usado en este experimento presenta reactividad cruzada. Preferiblemente, la especie animal empleada

en este experimento es la rata.

Los animales tratados con el anticuerpo control muestran unas señales de dolor significativas más intensas, comparado con los animales que recibieron un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:1, o que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:2. Esto demuestra la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del dolor.

Ejemplo 9: Eficacia terapéutica de un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende la SEQ ID NO:3 o 4

Se repiten los ejemplos 2-7. Como antagonista de GM-CSF, se emplea un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:3, o que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:4. Puede emplearse otra especie distinta del ratón, en particular una especie para la cual el anticuerpo usado en este experimento presenta reactividad cruzada. Preferiblemente, la especie animal empleada en este experimento es la rata.

Los animales, por ejemplo, ratas, tratados con el anticuerpo control muestran unas señales de dolor significativas más intensas, comparado con los animales que recibieron un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada como se indica en SEQ ID NO:3, o que comprende una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera como se indica en SEQ ID NO:4. Esto demuestra la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del dolor.

Ejemplo 10: Eficacia terapéutica de un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende SEQ ID NO:5-20

Se repiten los ejemplos 2-7. Como antagonista de GM-CSF, se emplea un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende una secuencia de H-CDR3 seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO:5-16. Preferiblemente, dichos anticuerpos comprenden además la secuencia de H-CDR1 de SEQ ID NO:16 y/o la secuencia de H-CDR2 de SEQ ID NO:18 y/o la secuencia de L-CDR1 de SEQ ID NO:19 y/o la secuencia de L-CDR2 de SEQ ID NO:20 y/o la secuencia de L-CDR3 de SEQ ID NO:21. Puede emplearse otra especie distinta del ratón, en particular una especie para la cual el anticuerpo usado en este experimento presenta reactividad cruzada. Preferiblemente, la especie animal empleada en este experimento es la rata.

Los animales, por ejemplo, ratas, tratados con el anticuerpo control muestran unas señales de dolor significativas más intensas, comparado con los animales que recibieron un anticuerpo específico de GM-CSF según el presente ejemplo. Esto demuestra la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del dolor.

Ejemplo 11: Eficacia terapéutica de un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende SEQ ID NO:21-26

Se repiten los ejemplos 2-7. Como antagonista de GM-CSF, se emplea un anticuerpo específico de GM-CSF que comprende la secuencia de L-CDR1 de SEQ ID NO:22 y/o la secuencia de L-CDR2 de SEQ ID NO:23 y/o la secuencia de L-CDR3 de SEQ ID NO:24 y/o la secuencia de H-CDR1 de SEQ ID NO:25 y/o la secuencia de H-CDR2 de SEQ ID NO:26 y/o la secuencia de H-CDR3 de SEQ ID NO:27. Preferiblemente, dicho anticuerpo comprende todas las CRD de SEQ ID NO:22-28. Puede emplearse otra especie distinta del ratón, en particular una especie para la cual el anticuerpo usado en este experimento presenta reactividad cruzada. Preferiblemente, la especie animal empleada en este experimento es la rata.

Los animales, por ejemplo, ratas, tratados con el anticuerpo control muestran unas señales de dolor significativas más intensas, comparado con los animales que recibieron un anticuerpo específico de GM-CSF según el presente ejemplo. Esto demuestra la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del dolor.

Ejemplo 12: Eficacia terapéutica de anticuerpos específicos para el receptor de GM-CSF

Se repiten los ejemplos 2-7. Como antagonista de GM-CSF, se emplea un anticuerpo específico del receptor de GM-CSF que comprende una secuencia de aminoácidos de una secuencia de H-CDR3 mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO:28-46. Puede emplearse otra especie distinta del ratón, en particular una especie para la cual el anticuerpo usado en este experimento presenta reactividad cruzada. Preferiblemente, la especie animal empleada en este experimento es la rata.

Los animales, por ejemplo, ratas, tratados con el anticuerpo control muestran unas señales de dolor significativas más intensas, comparado con los animales que recibieron un anticuerpo específico del receptor de GM-CSF según el presente ejemplo. Esto demuestra la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del dolor.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en la presente es susceptible a variaciones y modificaciones diferentes a las descritas específicamente.

Bibliografía

Brennan *et al.*, Pain, 64:493-501, 1996.

Ghose *et al.*, J. Combin. Chem., 7:55-68, 1999.

Hargreaves *et al.*, 1988.

Knappik *et al.*, J. Mol. Biol., 296:57, 2000.

Krebs *et al.*, J. Immunol. Methods, 254:67, 2001.

5 Kuzuna *et al.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokio), 23:1184-1191, 1975.

Lipinski *et al.*, Adv. Drug Del. Rev., 23:3-25, 1997.

Luger *et al.*, Pain, 99:397-406, 2002.

Pearson *et al.*, Arthritis Rheum., 2:440-459, 1959.

Rothe *et al.*, J. Mol. Biol., 376:1182, 2008.

10 Schwei *et al.*, J. Neuroscience, 79:10886-10897, 1999.

Listado de secuencias

<110> THE UNIVERSITY OF MELBOURNE
HAMILTON, John (US Only) COOK, Andrew (US Only)

<120> Tratamiento del dolor

15 <130> 30898435/EJH

<150> US 61/139,687

<151> 2008-12-22

<150> US 61/164,491

<151> 2009-03-30

20 <160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada

<400> 1

ES 2 685 895 T3

Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His
1 5 10 15

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

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
35 40 45

Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp
50 55 60

Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu
65 70 75 80

Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
85 90 95

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

Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser
130 135 140

5 <210> 2
<211> 150
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera

ES 2 685 895 T3

<400> 2

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

1 5 10 15

Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln

20 25 30

Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys

35 40 45

Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly

65 70 75 80

Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ser Lys Gly Glu Phe

145 150

<210> 3
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada

<400> 3

Gln 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 Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Glu Asn Lys Tyr Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Gly Thr Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

10

<210> 4
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera

ES 2 685 895 T3

<400> 4

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Ser Ile Gly Lys Lys Tyr Ala

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser

50 55 60

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu

65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Gly Lys Gly Met Val Phe Gly Gly

85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105

5 <210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>

10 <223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 5

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp

1 5 10

<210> 6

<211> 10

15 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 6

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
5 <213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 7
Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
15 <223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 8
Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 9
Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro
1 5 10

25 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

<400> 10
Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp
1 5 10

35 <210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)

40 <400> 11

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser
1 5 10
<210> 12
<211> 10
<212> PRT
5 <213> artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens sCDR3 (H-CDR3)
<400> 12
Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr
1 5 10
10 <210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
15 <223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
<400> 13
Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
20 <210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens sCDR3 (H-CDR3)
<400> 14
Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn
1 5 10
25 <210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
30 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
<400> 15
Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro
1 5 10
35 <210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> secuencia de aminoácidos de Homo sapiens CDR3 (H-CDR3)
40 <400> 16

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
5 <213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR1 pesada (H-CDR1)

<400> 17
Asp Tyr Leu Leu His
1 5

10 <210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
15 <223> secuencia de aminoácidos de CDR2 pesada (H-CDR2)

<400> 18
Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

20 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR1 ligera (L-CDR1)

<400> 19
Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn
25 1 5 10

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR2 ligera (L-CDR2)

<400> 20
Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

35 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 ligera (L-CDR3)

<400> 21
Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr

1 5

5 <210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR1 ligera (L-CDR1)

10 <400> 22
Arg Ala Ser His Arg Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
15 <213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR2 ligera (L-CDR2)

<400> 23
Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

20 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
25 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 ligera (L-CDR3)

<400> 24
Gln Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Val Thr

1 5

30 <210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 25
Gly Tyr Ile Phe Pro Thr Phe Ala Leu His

35 1 5 10

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR2 pesada (H-CDR2)

<400> 26

Ser Ile Asn Thr Ala Ser Gly Lys Thr Lys Phe Ser Thr Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
5 <213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 27
Asp Arg Phe Gln Asn Ile Met Ala Thr Ile Leu Asp Val
1 5 10

10 <210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
15 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 28
Val Gly Ser Phe Ser Gly Ile Ala Tyr Arg Pro
1 5 10

20 <210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 29
Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu Arg Pro

25 1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 30
Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Thr Tyr Gly Tyr
1 5 10

35 <210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

40 <400> 31

Val Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Pro Tyr Arg Pro
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
5 <213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 32
Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu
1 5 10

10 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
15 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 33
Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Val Tyr Gly Leu
1 5 10

20 <210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 34
Val Gly Ser Phe Ser Pro Pro Ala Tyr Arg Pro
1 5 10

25 <210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

30 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

<400> 35
Val Gly Ser Phe Ser Pro Val Thr Tyr Gly Leu
1 5 10

35 <210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

40 <400> 36
Val Gly Ser Phe Ser Gly Leu Ala Tyr Arg Pro
1 5 10

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)
 <400> 37
 Val Gly Ser Phe Ser Pro Ile Thr Tyr Gly Leu
 1 5 10
 <210> 38
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)
 15 <400> 38
 Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)
 <400> 39
 Val Gly Ser Phe Ser Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10
 25 <210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)
 <400> 40
 Leu Gly Ser Val Thr Ala Trp Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)
 <400> 41
 Ala Gly Ser Ile Pro Gly Trp Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10
 40 <210> 42

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

 <220>
 5 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

 <400> 42
 Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

 1 5 10

 <210> 43
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

 <400> 43
 Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Met Gly Leu

 15 1 5 10

 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

 <400> 44
 Val Gly Ser Phe Ser Gly Pro Ala Leu His Leu

 1 5 10

 <210> 45
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

 30 <400> 45
 Val Gly Ser Val Ser Arg Ile Thr Tyr Gly Phe

 1 5 10

 <210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de CDR3 pesada (H-CDR3)

 <400> 46
 Val Gly Ser Phe Ser Pro Leu Thr Leu Gly Leu

 1 5 10

 40

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un antagonista de GM-CSF para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en el que dicho antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF o un anticuerpo específico para el receptor de GM-CSF, y en el que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico.
- 2.- Un antagonista de GM-CSF para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un ser humano.
- 3.- Un antagonista de GM-CSF para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho antagonista es un anticuerpo específico para el receptor de GM-CSF.
- 10 4.- Un antagonista de GM-CSF para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF.
- 5.- Un antagonista de GM-CSF para su uso según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:4.
- 15 6.- Una composición que comprende un antagonista de GM-CSF para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto, en la que el antagonista es un anticuerpo específico para GM-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:3, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:4, y en la que dicho dolor es dolor de cáncer óseo o dolor postquirúrgico, y en la que dicha composición comprende además uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

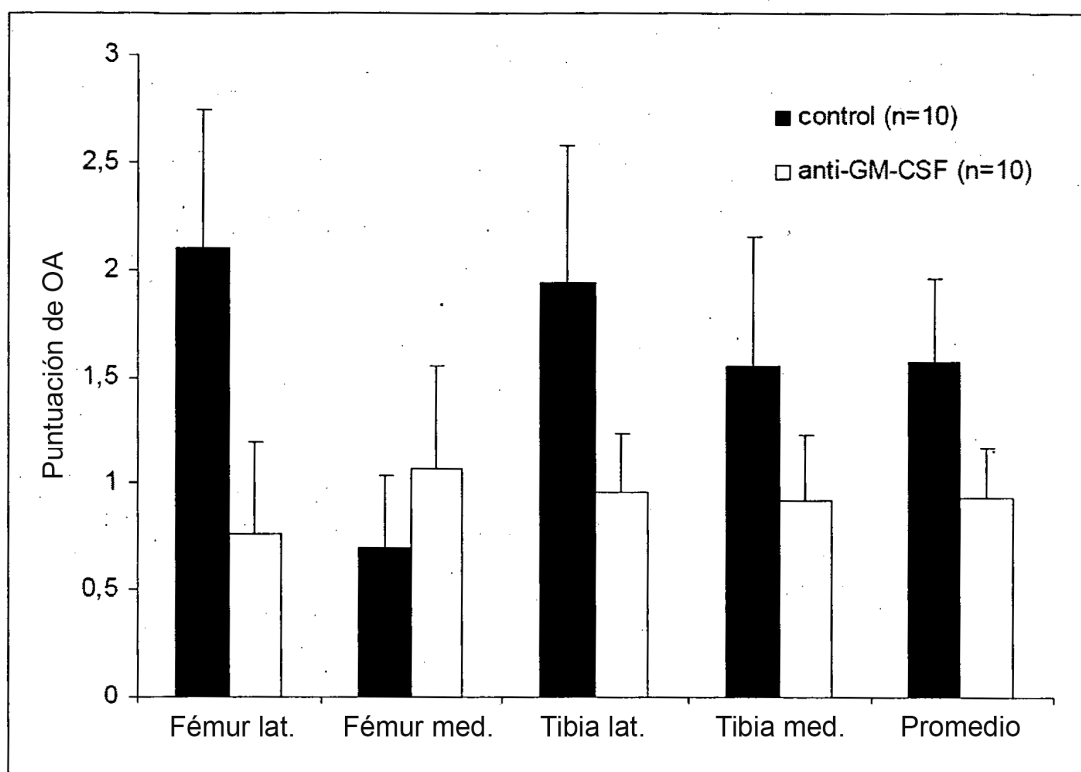
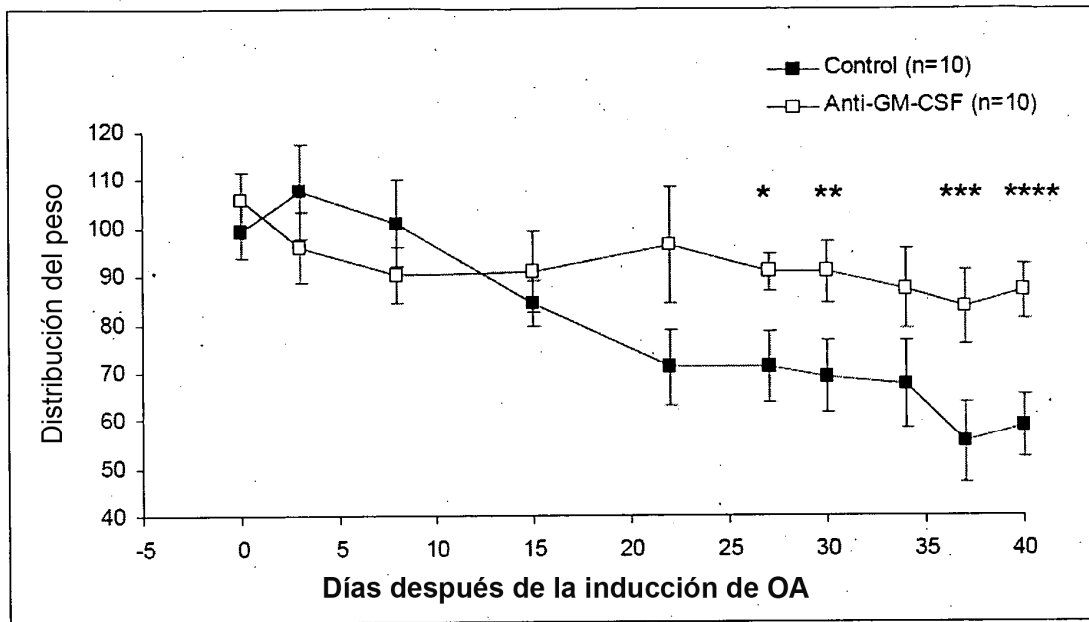


Figura 1



Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ PEE.

* $p=0,04$, ** $p=0,04$, *** $p=0,02$, **** $p=0,005$, Ensayo de la t desapareado.

Figura 2

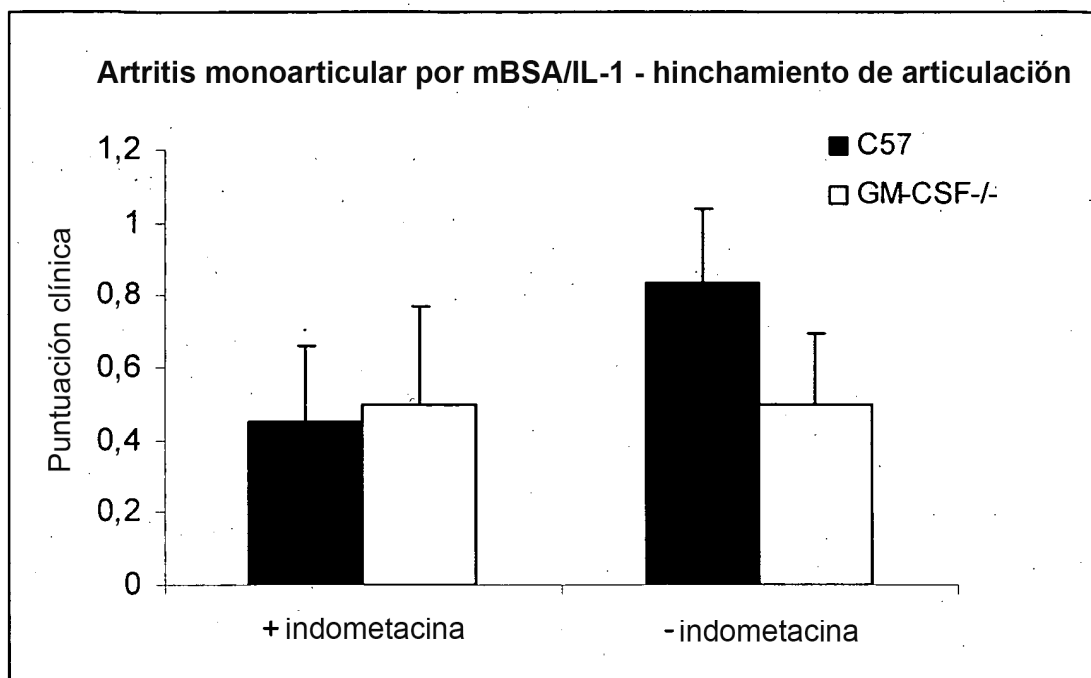


Figura 3

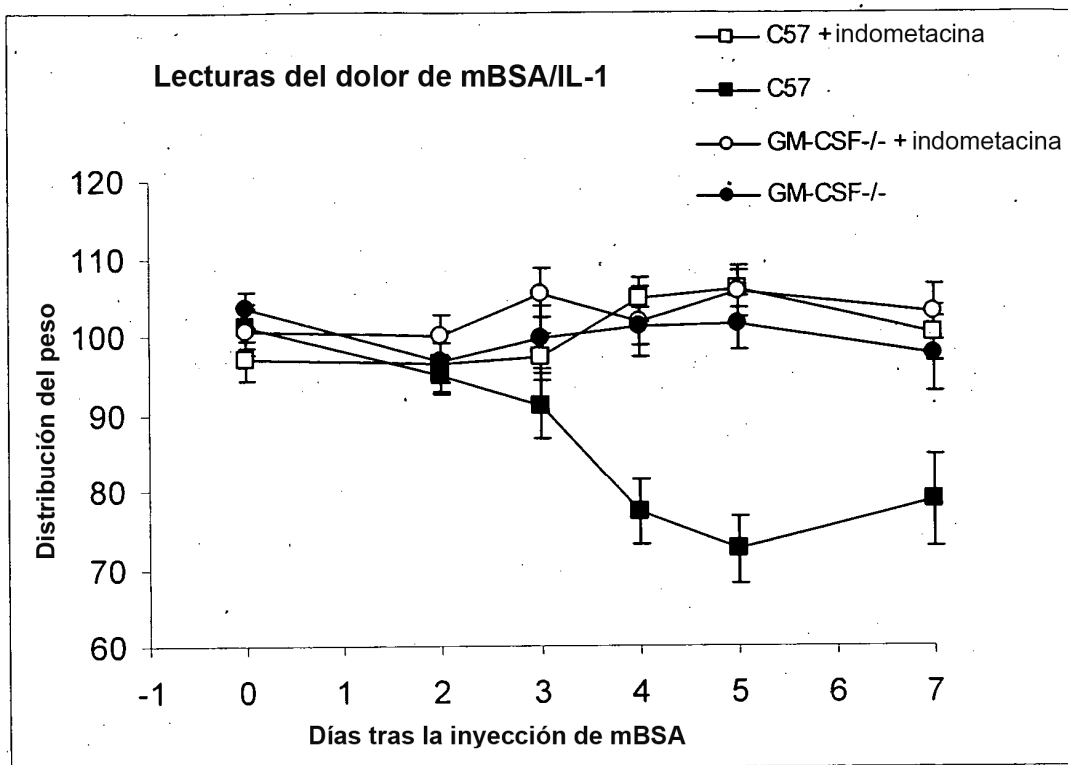


Figura 4

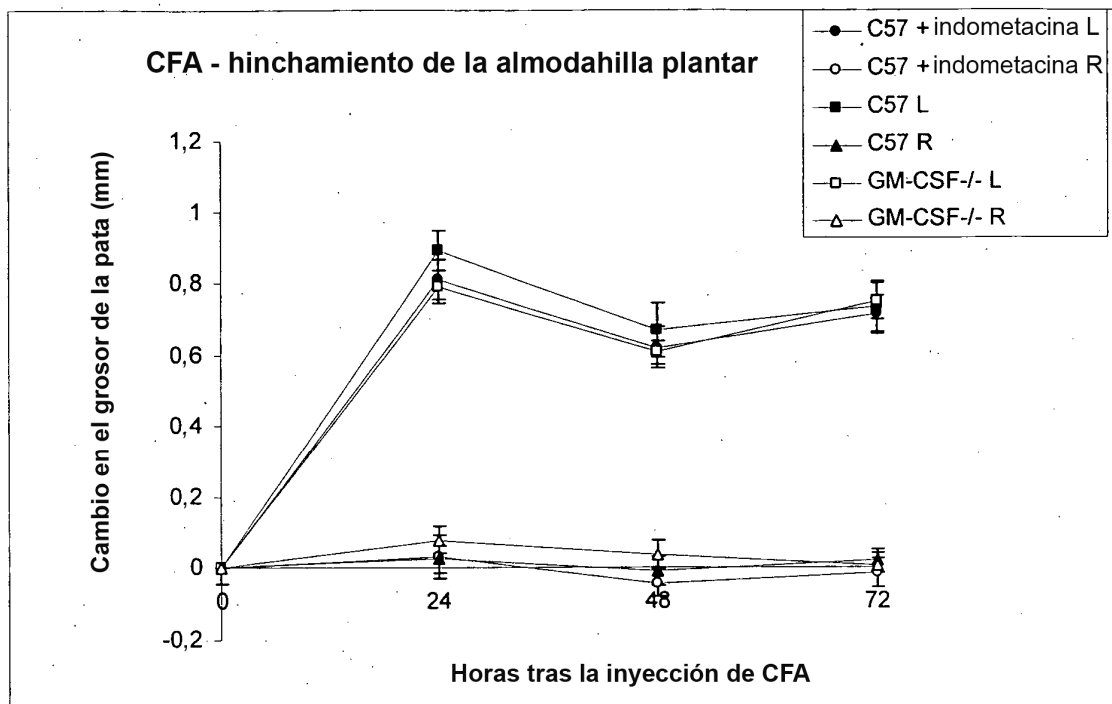


Figura 5

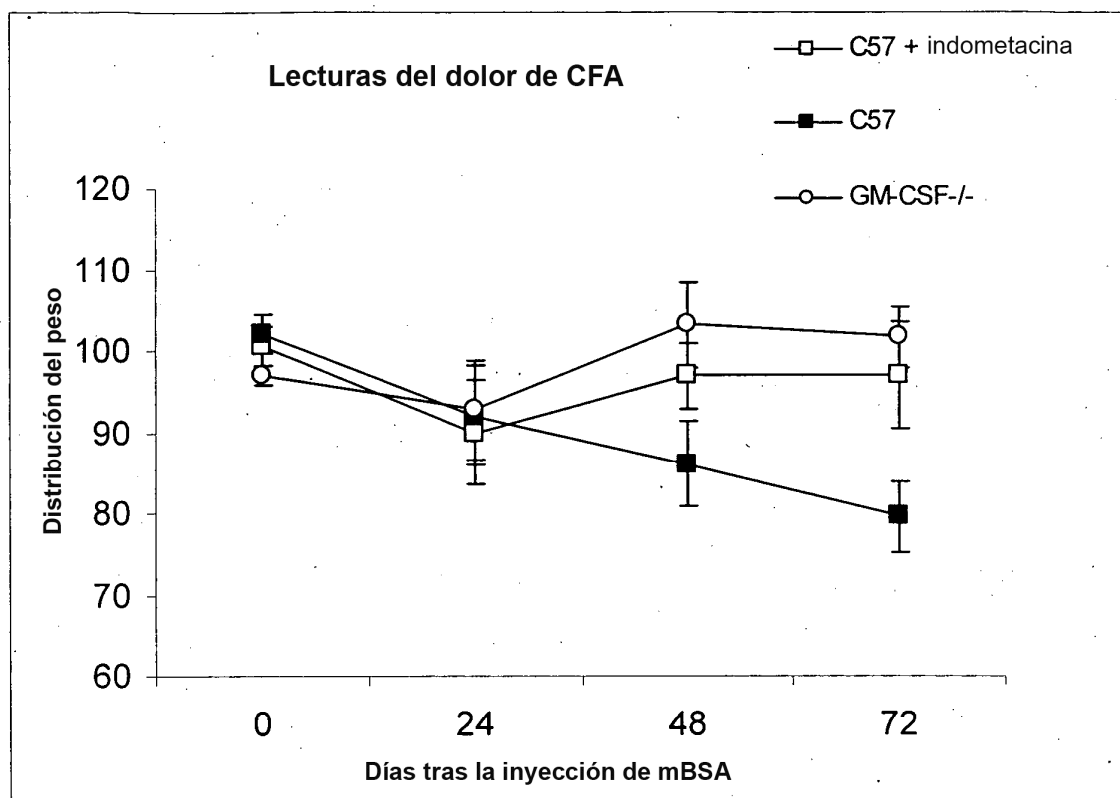


Figura 6