

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 835**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
A61P 19/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01)
C07K 16/24	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2009 PCT/US2009/041981**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09134805**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09739607 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2280732**

54 Título: **Anticuerpos contra el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos**

30 Prioridad:
28.04.2008 US 48522

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2019

73 Titular/es:
**HUMANIGEN, INC. (100.0%)
533 Airport Boulevard, Suite 400
Burlingame, CA 94010, US**

72 Inventor/es:
**BEBBINGTON, CHRISTOPHER, R.;
LUEHRSEN, KENNETH y
YARRANTON, GEOFFREY, T.**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 704 835 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

Anticuerpos contra el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

Antecedentes de la invención

- 5 El "factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos" (GM-CSF, por sus siglas en inglés) es una pequeña glicoproteína que se produce en respuesta a varios mediadores inflamatorios por células presentes en el entorno hematopoyético y en los sitios periféricos de inflamación. GM-CSF es capaz de estimular la producción de granulocitos neutrófilos, macrófagos y colonias mixtas de granulocitos-macrófagos a partir de células de la médula ósea y puede
- 10 puede estimular algunas actividades funcionales en granulocitos y macrófagos maduros e inhibe la apoptosis de granulocitos y macrófagos.

GM-CSF ha sido propuesto para desempeñar un papel en la patogénesis de varias enfermedades. Por lo tanto, existe la necesidad de terapias adicionales dirigidas a GM-CSF. La presente invención proporciona anticuerpos anti-GM-CSF mejorados, *p. ej.*, para el tratamiento de enfermedades en las que GM-CSF es parte del mecanismo patogénico.

Breve compendio de la invención

15 La invención se refiere a anticuerpos anti-GM-CSF, *p. ej.*, anticuerpos humanizados por ingeniería genética, y al uso de tales anticuerpos para el tratamiento de enfermedades para las que es deseable inhibir la señalización del receptor GM-CSF.

Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo anti-GM-CSF, que comprende:

- 20 (a) una región V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; y
- (b) una región V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En una realización, el anticuerpo es una IgG.

- 25 En una realización, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 y una región constante de cadena ligera kappa que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo anti-GM-CSF.

- 30 La invención también proporciona el anticuerpo anti-GM-CSF para uso como un medicamento; para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria crónica; y para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene osteopenia, artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, púrpura trombocitopénica idiopática, insuficiencia cardíaca, daño cardíaco debido a un evento isquémico o diabetes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona ejemplos de secuencias V_H y V_L de anticuerpos anti-GM-CSF.

- 35 Figura 2. Unión de GM-CSF a Ab1 (A) o Ab2 (B) determinada por análisis de resonancia de plasmón de superficie a una temperatura de 37°C (Biacore 3000). Ab1 y Ab2 se capturaron en anticuerpos policlonales anti Fab inmovilizados sobre el chip Biacore. Se inyectaron diferentes concentraciones de GM-CSF sobre la superficie como se indica. El análisis de ajuste global se llevó a cabo suponiendo una interacción 1:1 utilizando el software Scrubber2.

- 40 Figura 3. Unión de Ab1 y Ab2 a GM-CSF glicosilado y no glicosilado. La unión a GM-CSF glicosilado expresado a partir de células 293 humanas o GM-CSF no glicosilado expresado en *E. coli* se determinó mediante ELISA. Se muestran los resultados representativos de un solo experimento (exp 1). Se aplicaron diluciones dobles de Ab1 y Ab2 empezando por 1500 ng/ml a los pocillos recubiertos con GM-CSF. Cada punto representa la media ± error estándar para determinaciones por triplicado. El ajuste de la curva sigmoidea se realizó utilizando el software Prism 5.0 (Graphpad).

- 45 Figura 4. ELISA de competición que demuestra la unión de Ab1 y Ab2 a un epítipo compartido. Las placas ELISA recubiertas con 50 ng/pocillo de GM-CSF recombinante se incubaron con diversas concentraciones de anticuerpo (Ab2, Ab1 o anticuerpo control de isotipo) junto con Ab2 biotinilado 50 nM. La unión del anticuerpo biotinilado se ensayó utilizando un conjugado de neutravidina-HRP. La competición para unirse a GM-CSF fue durante 1 hora (A) o durante 18 horas (B). Cada punto representa la media ± error estándar para determinaciones por triplicado. El ajuste de la curva sigmoidea se realizó utilizando el software Prism 5.0 (Graphpad).
- 50

Figura 5. Inhibición de la expresión de IL-8 inducida por GM-CSF. Se incubaron varias cantidades de cada anticuerpo con 0.5 ng/ml de GM-CSF y se incubaron con células U937 durante 16 horas. La IL-8 secretada en el sobrenadante

del cultivo se determinó mediante ELISA.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-GM-CSF, que comprende:

- 5 (a) una región V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; y
- (b) una región V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7.

10 Como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo" se refiere a una proteína funcionalmente definida como una proteína de unión y estructuralmente definida como que comprende una secuencia de aminoácidos que un experto en la materia reconoce que se obtiene a partir de la región marco de un gen que codifica inmunoglobulina de un animal que produce anticuerpos. Un anticuerpo puede consistir en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, 15 IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Se sabe que una unidad estructural típica de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. 20

El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente memoria también incluye fragmentos de anticuerpos que conservan la especificidad de unión. Por ejemplo, hay una serie de fragmentos de anticuerpos bien caracterizados. 25 Así, por ejemplo, la pepsina digiere a los enlaces disulfuro de un anticuerpo C-terminal en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que es una cadena ligera unida a $VH-CH1$ por un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ se puede reducir bajo condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero $(Fab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Mientras que varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que los fragmentos se pueden sintetizar *de novo* utilizando una metodología de ADN recombinante o químicamente. Por lo tanto, el término "anticuerpo", como se utiliza aquí, incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados utilizando metodologías de ADN recombinante. 30

Los anticuerpos como se utilizan aquí también incluyen varios formatos de pares V_H-V_L , que incluyen los anticuerpos de cadena única (anticuerpos que existen como una sola cadena polipeptídica), *p. ej.*, anticuerpos Fv de cadena única (sFv o scFv), en los que una región pesada variable y una región ligera variable se unen (directamente o a través de un conector peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de cadena única es un V_H-V_L unido covalentemente que se puede expresar a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican V_H y V_L , ya sea unidas directamente o unidas por un conector de codificación peptídica (*p. ej.*, Huston, *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, 1988). Mientras que V_H y V_L están conectados a cada uno como una sola cadena polipeptídica, los dominios V_H y V_L se asocian de manera no covalente. Un anticuerpo también puede estar en otra forma de fragmento, tal como un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv). También se pueden generar otros fragmentos, *p. ej.*, utilizando técnicas recombinantes, como proteínas solubles o como fragmentos obtenidos a partir de métodos de 35 visualización. Los anticuerpos también pueden incluir dianticuerpos y minianticuerpos.

Los anticuerpos de la invención también incluyen dímeros de cadena pesada, tales como anticuerpos de camélidos. Dado que la región V_H de un dímero de cadena pesada de IgG en un camélido no tiene que realizar interacciones hidrofóbicas con una cadena ligera, la región en la cadena pesada que normalmente contacta con una cadena ligera se cambia a restos de aminoácidos hidrófilos en un camélido. Los dominios V_H de los dímeros de cadena pesada de las IgG se denominan dominios VHH. Los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen adicionalmente anticuerpos de dominio único (dAbs) y nanocuerpos (véase, *p. ej.*, Cortez-Retamozo, *et al., Cancer Res.* 64:2853-2857, 2004). 50

Tal como se utiliza en la presente memoria, "región V" se refiere a un dominio de región variable de anticuerpo que comprende los segmentos del Marco 1, CDR1, Marco 2, CDR2 y Marco 3, que incluye CDR3 y Marco 4, cuyos segmentos se añaden al segmento V como una consecuencia de la reorganización de los genes de la región V de la cadena pesada y de la cadena ligera durante la diferenciación de las células B. Un "segmento V", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la región de la región V (cadena pesada o ligera) que está codificada por un gen V. El segmento V de la región variable de la cadena pesada codifica FR1-CDR1-FR2-CDR2 y FR3. Para los fines de esta invención, el segmento V de la región variable de la cadena ligera se define como que se extiende a través de FR3 55

hasta CDR3.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "segmento J" se refiere a una subsecuencia de la región variable codificada que comprende una porción C-terminal de una CDR3 y la FR4. Un segmento J endógeno está codificado por un gen J de inmunoglobulina.

Como se utiliza en la presente memoria, "región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés)" se refiere a las tres regiones hipervariables en cada cadena que interrumpen las cuatro regiones "marco" establecidas por las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. Las CDR son las principales responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se suelen denominar CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y también se suelen identificar típicamente por la cadena en la que se localiza la CDR particular. Así, por ejemplo, una V_H CDR3 se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una V_L CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.

Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco de un anticuerpo, es decir, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para colocar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR y las regiones marco se pueden determinar utilizando varias definiciones bien conocidas en la técnica, p.ej. Kabat, Chothia, international ImMunoGeneTics database (IMGT), y AbM (véase, p.ej., Johnson *et al.*, *supra*; Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917; Chothia C. *et al.*, 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883; Chothia C. *et al.*, 1992, structural repertoire of the human VH segments *J. Mol. Biol.* 227, 799-817; Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1997, 273(4)). Las definiciones de los sitios de combinación de antígenos también se describen a continuación: Ruiz *et al.*, IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.*, 28, 219-221 (2000); y Lefranc, M.-P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;29(1):207-9 (2001); MacCallum *et al.*, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, *J. Mol. Biol.*, 262 (5), 732-745 (1996); y Martin *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989); Martin, *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203, 121-153, (1991); Pedersen *et al.*, *Immunomethods*, 1, 126, (1992); y Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 1996).

"Epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítipos se pueden formar a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p.ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996).

El término "determinante de especificidad de unión" o "BSD, por sus siglas en inglés" como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a la secuencia de aminoácidos mínima contigua o no contigua dentro de una región CDR necesaria para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo. En la presente invención, los determinantes mínimos de especificidad de unión residen dentro de una porción o de la longitud completa de las secuencias CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo anti-GM-CSF" o "anticuerpo GM-CSF" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que se une a GM-CSF e inhibe la actividad del receptor de GM-CSF. Tales anticuerpos se pueden identificar utilizando cualquier número de ensayos reconocidos en la técnica que evalúan la unión y/o función de GM-CSF. Por ejemplo, se pueden utilizar ensayos de unión tales como ensayos ELISA que miden la inhibición de la unión de GM-CSF a la subunidad del receptor alfa. Los ensayos basados en células para la señalización del receptor de GM-CSF, tal como los ensayos que determinan la velocidad de proliferación de una línea celular dependiente de GM-CSF en respuesta a una cantidad límite de GM-CSF, también se emplean convenientemente, al igual que los ensayos que miden cantidades de producción de citoquinas, p. ej., producción de IL-8, en respuesta a la exposición de GM-CSF.

Como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que se une a GM-CSF e inhibe la señalización por el receptor de GM-CSF, o inhibe la unión de GM-CSF a su receptor.

Como se utiliza en la presente memoria, "Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos" (GM-CSF) se refiere a una glicoproteína pequeña de origen natural con enlaces disulfuro internos que tienen un peso molecular de aproximadamente 23 kDa. En los seres humanos, está codificado por un gen localizado dentro del agrupamiento de citoquinas en el cromosoma 5 humano. Se conocen la secuencia del gen humano y la proteína. La proteína tiene una secuencia señal N-terminal y un dominio de unión al receptor C-terminal (Rasko and Gough In: The Cytokine Handbook, A. Thomson, *et al.*, Academic Press, Nueva York (1994) páginas 349-369). Su estructura tridimensional

es similar a la de las interleucinas, aunque las secuencias de aminoácidos no son similares. El GM-CSF se produce en respuesta a varios mediadores inflamatorios presentes en el entorno hemopoyético y en sitios periféricos de inflamación. El GM-CSF es capaz de estimular la producción de granulocitos neutrófilos, macrófagos y colonias mixtas granulocitos-macrófagos a partir de células de médula ósea y puede estimular la formación de colonias de eosinófilos a partir de células progenitoras de hígado fetal. El GM-CSF también puede estimular algunas actividades funcionales en granulocitos y macrófagos maduros e inhibe la apoptosis de granulocitos y macrófagos.

El término "constante de disociación de equilibrio" o "afinidad", abreviada (K_D), se refiere a la constante de velocidad de disociación (k_d , tiempo⁻¹) dividida por la constante de velocidad de asociación (k_a , tiempo⁻¹ M⁻¹). Las constantes de disociación de equilibrio se pueden medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de alta afinidad. Tales anticuerpos tienen una afinidad monovalente mejor (menos) que aproximadamente 10 nM, y con frecuencia mejor que aproximadamente 500 pM o mejor que aproximadamente 50 pM, según lo determinado por el análisis de resonancia de plasmón de superficie realizado a una temperatura de 37°C. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención tienen una afinidad (medida utilizando resonancia de plasmón de superficie), de menos de 50 pM, típicamente aproximadamente 25 pM.

En algunas realizaciones, un anti-GM-CSF de la invención tiene una velocidad de disociación lenta con una constante de velocidad de disociación (k_d) determinada mediante análisis de resonancia de plasmón de superficie a una temperatura de 37°C para la interacción monovalente con GM-CSF menor que aproximadamente 10⁻⁴ s⁻¹, preferiblemente menor que 5 x 10⁻⁵ s⁻¹ y lo más preferiblemente menor que 10⁻⁵ s⁻¹.

Como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula de inmunoglobulina en las CDR a partir de un anticuerpo donante que se injertan en secuencias marco humanas. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos de origen donante en las secuencias marco. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. La humanización se puede realizar utilizando métodos conocidos en la técnica (p. ej., Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525; 1986; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1988; Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536, 1988); Presta, *Curr. Op. Struct Biol.* 2:593-596, 1992; Patente de EE.UU. n° 4.816.567), que incluye técnicas tal como la "superhumanización" de anticuerpos (Tan *et al.*, *J. Immunol.* 169: 1119, 2002) y "remodelación de la superficie" ("resurfacing") (p. ej., Staelens *et al.*, *Mol. Immunol.* 43: 1243, 2006; y Roguska *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci USA* 91: 969, 1994).

Un anticuerpo "humanizado por ingeniería genética" en el contexto de esta invención se refiere a un anticuerpo humano modificado que tiene una especificidad de unión de un anticuerpo de referencia. Un anticuerpo "humanizado por ingeniería genética" para uso en esta invención tiene una molécula de inmunoglobulina que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina donante. Típicamente, un anticuerpo es "humanizado por ingeniería genética" uniendo una secuencia de ADN que codifica un determinante de especificidad de unión (BSD) de la región CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo de referencia a la secuencia del segmento V_H humano y un BSD de CDR3 de cadena ligera del anticuerpo de referencia a una secuencia del segmento V_L humano. Un "BSD" se refiere a una región CDR3-FR4, o una parte de esta región que media la especificidad de unión. Por lo tanto, un determinante de especificidad de unión puede ser una región CDR3-FR4, una región CDR3, un determinante de especificidad de unión esencial mínima de una CDR3 (que se refiere a cualquier región más pequeña que la CDR3 que confiere especificidad de unión cuando está presente en la región V de un anticuerpo), el segmento D (con respecto a una región de cadena pesada), u otras regiones de CDR3-FR4 que confieren la especificidad de unión de un anticuerpo de referencia. Los métodos para la humanización se proporcionan en la solicitud de patente de EE.UU. n° de publicación 20050255552 y en la solicitud de patente de EE.UU. n° de publicación 20060134098.

Un anticuerpo "humano" como se utiliza en la presente memoria abarca anticuerpos humanizados y humanizados por ingeniería genética, así como anticuerpos monoclonales humanos que se obtienen utilizando técnicas conocidas.

El término "híbrido" cuando se utiliza con referencia a porciones de un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína comprende dos o más subsecuencias que normalmente no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, con dos o más secuencias, p. ej., a partir de genes no relacionados dispuestos para formar un nuevo ácido nucleico funcional. De manera similar, una proteína híbrida se refiere a dos o más subsecuencias que normalmente no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza.

El término "recombinante" cuando se utiliza con referencia, p. ej., a una célula o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico nativo o proteína nativa, o que la célula se obtiene a partir de una célula así modificada. Así, p. ej., las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que por otro lado se expresan de manera anormal, están infraexpresados o no se expresan en absoluto. Por el término "ácido nucleico recombinante" en la presente memoria se entiende el ácido nucleico, originalmente formado in vitro, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, p. ej., utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza. De esta manera, se consigue un enlace operable de diferentes secuencias. Por lo tanto, un ácido

- nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado in vitro ligando moléculas de ADN que normalmente no están unidas, se consideran recombinantes para los fines de esta invención. Se entiende que una vez que se elabora un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula hospedadora u organismo hospedador, se replicará de forma no recombinante, es decir, utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula hospedadora en lugar de las manipulaciones in vitro; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente se replican de forma no recombinante, todavía se consideran recombinantes para los fines de la invención. De manera similar, una "proteína recombinante" es una proteína elaborada utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se muestra arriba.
- La frase "específicamente (o selectivamente) unido" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión donde el anticuerpo se une a la proteína de interés. En el contexto de esta invención, el anticuerpo se une al antígeno de interés, p. ej., GM-CSF, con una afinidad que es al menos 100 veces mejor que su afinidad por otros antígenos.
- Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas (o ácido nucleico), se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos (o nucleótidos) que son iguales (es decir, aproximadamente 60% de identidad, preferiblemente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o una identidad superior sobre una región específica, cuando se compara y alinea para obtener una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada) según lo medido utilizando algoritmos de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados descritos a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, p. ej., el sitio web de NCBI). Después se dice que tales secuencias son "sustancialmente idénticas". Las secuencias "sustancialmente idénticas" también incluyen secuencias que tienen deleciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones, así como las que se producen de forma natural, p. ej., variantes polimórficas o alélicas, y variantes hechas por el hombre. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta huecos y similares. Preferiblemente, la identidad de la secuencia de la proteína existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que tiene 50-100 aminoácidos de longitud, o sobre la longitud de una proteína.
- Una "ventana de comparación", como se utiliza en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de una de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste típicamente de 20 a 600, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en la que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias por comparación se puede realizar, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, p. ej., Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)).
- Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acidos Res.* 25:3389-3402 (1977) y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Se utilizan BLAST y BLAST 2.0, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para ácidos nucleicos y proteínas. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valor predeterminado una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.
- Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente mediante técnicas de química analítica tal como la electroforesis en gel de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación se purifica sustancialmente. El término "purificado" en algunas realizaciones denota que una proteína origina esencialmente una banda en un gel electroforético. Preferiblemente, significa que la proteína es al menos un 85% pura, más preferiblemente al menos un 95% pura, y lo más preferiblemente al menos un 99% pura.
- Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos naturales, aquellos que contienen restos modificados, y polímeros de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y aminoácidos miméticos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que después se modifican, p. ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, p. ej., un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p. ej., homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metil metionina sulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (p. ej., norleucina) o las cadenas principales peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los aminoácidos miméticos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido natural.

Los aminoácidos se pueden mencionar en la presente memoria ya sea por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, igualmente, se pueden mencionar por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

"Variantes modificadas de manera conservativa" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de manera conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas, p. ej., naturalmente contiguas. Debido a la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente memoria que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un experto reconocerá que en ciertos contextos, cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, a menudo las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido están implícitas en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de sondas reales.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que altera, añade o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservadora" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadoras y las matrices de sustitución tales como BLOSUM que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservadora son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos. Las sustituciones conservadoras típicas entre sí incluyen: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, Proteins (1984)).

I. Introducción

La invención se refiere a anticuerpos que se unen con alta afinidad a GM-CSF y son antagonistas de GM-CSF. Los anticuerpos comprenden regiones variables con un alto grado de identidad con las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana. En la presente memoria se describe que en realizaciones preferidas, la secuencia de BSD en CDRH3 de un anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos RQRFPY o RDRFPY, y la BSD en CDRL3 puede comprender FNK o FNR. En esta invención, la secuencia V_H del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 5 y la secuencia V_L comprende la SEQ ID NO: 7.

En la presente memoria se describe que se pueden generar regiones V completas en las que el BSD forma parte de la CDR3 y se utilizan secuencias adicionales para completar la CDR3 y añadir una secuencia de FR4. Típicamente, la porción de la CDR3 que excluye el BSD y la FR4 completa están compuestas de secuencias de línea germinal humana. En algunas realizaciones, la secuencia de CDR3-FR4 que excluye el BSD se diferencia de las secuencias de la línea germinal humana en no más de 2 aminoácidos en cada cadena. En algunas realizaciones, el segmento J comprende un segmento J de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana se pueden determinar, por ejemplo, a través de la base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) y V-base disponibles públicamente (en la web mundial vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

El repertorio del segmento V de la línea germinal humana consta de 51 regiones V de cadena pesada, 40 segmentos V de cadena ligera κ , y 31 segmentos V de cadena ligera λ , lo que hace un total de 3,621 pares de región V de la línea germinal. Además, existen variantes alélicas estables para la mayoría de estos segmentos V, pero la contribución de estas variantes a la diversidad estructural del repertorio de la línea germinal es limitada. Las secuencias de todos los genes del segmento V de la línea germinal humana son conocidas y se puede acceder a ellas en la base de datos V-

base, proporcionada por el MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido. (véase también Chothia et al., 1992, J Mol Biol 227:776-798; Tomlinson et al., 1995, EMBO J 14:4628-4638; y Williams et al., 1996, J Mol Biol 264:220-232).

- 5 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como se describen en la presente memoria se pueden expresar en sistemas microbianos procarióticos o eucarióticos o en las células de eucariotas superiores tales como células de mamíferos.

Un anticuerpo que se emplea en la invención puede estar en cualquier formato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo completo que incluye una región constante, p. ej., una región constante humana, o puede ser un fragmento o derivado de un anticuerpo completo, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv o un anticuerpo de dominio único, tal como un nanocuerpo o un anticuerpo camélido.

II. Cadenas pesadas

Como se describe en la presente memoria, una cadena pesada de un anticuerpo anti-GM-CSF comprende una región V de cadena pesada que comprende los siguientes elementos:

- 15 1) secuencias del segmento V de cadena pesada humano que comprenden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3
 2) una región CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos R(Q/D)RFPY
 3) una región FR4 aportada por un segmento J del gen de la línea germinal humana.

En la Figura 1 se muestran ejemplos de secuencias del segmento V que permiten la unión a GM-CSF en combinación con un segmento CDR3-FR4 descrito anteriormente junto con una región V_L complementaria. Los segmentos V pueden ser, p. ej., de la subclase VH1 humana. En algunas realizaciones, el segmento V es un segmento de subclase V_H1 humano que tiene un alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos, p. ej., al menos 80%, 85% o 90% o mayor identidad, con el segmento de la línea germinal VH1 1-02 o VH1 1-03. En algunas realizaciones, el segmento V difiere en no más de 15 restos de VH1 1-02 o VH1 1-03 y preferiblemente no más de 7 restos.

Como se describe en la presente memoria, la secuencia de FR4 de los anticuerpos es proporcionada por un segmento de la línea germinal del gen JH1, JH3, JH4, JH5 o JH6 humano, o una secuencia que tiene un alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos con un segmento JH de la línea germinal humana. En algunas realizaciones, el segmento J es una secuencia JH4 de la línea germinal humana.

Como se describe en la presente memoria, la CDRH3 también comprende secuencias que se obtienen a partir de un segmento J humano. Típicamente, la secuencia de CDRH3-FR4 que excluye el BSD difiere en no más de 2 aminoácidos de un segmento J de la línea germinal humana. En realizaciones típicas, las secuencias del segmento J en CDRH3 son del mismo segmento J utilizado para las secuencias FR4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la región CDRH3-FR4 comprende el BSD y un segmento génico de línea germinal JH4 humano completo. A continuación se muestra una combinación ilustrativa de secuencias de CDRH3 y FR4, en las que el BSD está en negrita y los restos de JH4 del segmento J de la línea germinal humana están subrayados:

35 CDR3 .
 R(Q/D)RFPYYFDYWGQGLTVTVSS

Se describe en la presente memoria que un anticuerpo anti-GM-CSF puede comprender un segmento V que tiene al menos un 90% de identidad, o al menos un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, 99% o 100% de identidad con el segmento de línea germinal VH 1-02 o VH1-03; o con uno de los segmentos V de las regiones V_H que se muestran en la Figura 1, tal como una parte del segmento V de VH#1, VH#2, VH#3, VH#4 o VH#5. En esta invención, el anticuerpo tiene la región V_H de VH#5 (SEQ ID NO: 5).

Como se describe en la presente memoria, el segmento V de la región V_H puede tener una CDR1 y/o CDR2 como se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GM-CSF puede tener una CDR1 que tiene la secuencia GYYMH o NYIYH; o una CDR2 que tiene la secuencia WINPNSGGTNYAQKFQG o WINAGNGNTKYSQKFQG.

En la presente memoria se describe que un anticuerpo anti-GM-CSF puede tener una CDR1 y una CDR2 de uno de los segmentos V de la región V_H mostrados en la Figura 1 y una CDR3 que comprende R(Q/D)RFPY, p. ej., RDRFPYYFDY o RQRFPYYFDY. Por lo tanto, un anticuerpo anti-GM-CSF, por ejemplo, puede tener una CDR3-FR4 que tiene la secuencia R(Q/D)RFPYYFDYWGQGLTVTVSS y una CDR1 y/o CDR2 como se muestra en la Figura 1.

En la presente memoria se describe que una región V_H de un anticuerpo anti-GM-CSF puede tener una CDR3 que tiene un determinante de especificidad de unión R(Q/D)RFPY, una CDR2 de un segmento VH1 de la línea germinal humana o una CDR1 de un VH1 de la línea germinal humana. En algunas realizaciones, tanto la CDR1 como la CDR2 son de segmentos VH1 de la línea germinal humana.

III. Cadenas ligeras

Como se describe en la presente memoria, una cadena ligera de un anticuerpo anti-GM-CSF comprende la región V

de cadena ligera que comprende los siguientes elementos:

- 1) secuencias del segmento V de la cadena ligera humana que comprenden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3
- 2) una región CDRL3 que comprende la secuencia FNK o FNR, *p. ej.*, QQFNRSPLT o QQFNKSPLT.
- 3) una FR4 aportada por un segmento del gen J de la línea germinal humana.

La región V_L comprende un segmento V V_{λ} o V_{κ} . En la Figura 1 se proporciona un ejemplo de una secuencia V_{κ} que permite la unión en combinación con una región V_H complementaria.

Como se describe en la presente memoria, la secuencia de CDR3 de la región V_L comprende una secuencia derivada del segmento J. En realizaciones típicas, las secuencias del segmento J en CDRL3 son del mismo segmento J utilizado para FR4. Por lo tanto, la secuencia en algunas realizaciones puede diferir en no más de 2 aminoácidos de las secuencias del segmento V y del segmento J de la línea germinal κ humana. En algunas realizaciones, la región CDRL3-FR4 comprende el BSD y el segmento génico de línea germinal JK4 humana completa. Las combinaciones de CDRL3-FR4 ilustrativas para cadenas κ se muestran a continuación, en las que el determinante de especificidad de unión esencial mínimo se muestra en negrita y las secuencias de JK4 están subrayadas:

CDR3 .
QQ**FN**RSPLTFGGG**TK**VEIK
QQ**FN**KSPLTFGGG**TK**VEIK

Como se describe en la presente memoria, los segmentos V_{κ} son típicamente de la subclase VKIII. En algunas realizaciones, los segmentos tienen al menos 80% de identidad de secuencia a una subclase VKIII de línea germinal humana, *p. ej.*, al menos 80% de identidad a la secuencia VKIIIA27 de línea germinal humana. En algunas realizaciones, el segmento V_{κ} puede diferir en no más de 18 restos de VKIIIA27. En otras realizaciones, el segmento V de la región V_L de un anticuerpo anti-GMCSF tiene al menos 85% de identidad, o al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad a la secuencia del segmento V κ humano de una región V_L que se muestra en la Figura 1, por ejemplo, la secuencia del segmento V de VK#1, VK#2, VK#3 o VK#4. En esta invención, el anticuerpo tiene la región V_L de VK#2 (SEQ ID NO: 7).

En la presente memoria se describe que el segmento V de la región V_L puede tener una CDR1 y/o CDR2 como se muestra en la Figura 1. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GMCSF puede tener una secuencia de CDR1 de RASQSVGTNVA o RASQSIGSNLA; o una secuencia de CDR2 STSSRAT.

En la presente memoria se describe que un anticuerpo anti-GM-CSF puede tener una CDR1 y una CDR2 en una combinación como se muestra en uno de los segmentos V de las regiones V_L expuestas en la Figura 1 y una secuencia de CDR3 que comprende FNK o FNR, *p. ej.*, la CDR3 puede ser QQFNKSPLT o QQFNRSPLT. En algunas realizaciones, tal anticuerpo GM-CSF puede comprender una región FR4 que es FGGG**TK**VEIK. Por lo tanto, un anticuerpo anti-GM-CSF puede comprender, *p. ej.*, tanto la CDR1 como la CDR2 de una de las regiones V_L mostradas en la Figura 1 y una región CDR3-FR4 que es FGGG**TK**VEIK.

IV. Preparación de anticuerpos GM-CSF

En la presente memoria se describe que un anticuerpo anti-GM-CSF puede comprender cualquiera de las regiones V_H VH#1, VH#2, VH#3, VH#4 o VH#5 como se muestra en la Figura 1. En alguna realización, un anticuerpo puede comprender cualquiera de las regiones V_L VK#1, VK#2, VK#3 o VK#4 como se muestra en la Figura 1. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región V_H VH#1, VH#2, VH#3, VH#4 o VH#5 como se muestra en la Figura 1; y una región V_L VK#1, VK#2, VK#3 o VK#4 como se muestra en la Figura 1. En esta invención, el anticuerpo tiene una región V_H VH#5 como se muestra en la Figura 1 y una región V_L VK#2 como se muestra en la Figura 1.

Se puede analizar un anticuerpo para confirmar que el anticuerpo conserva la actividad de antagonizar la actividad de GM-CSF. La actividad antagonista se puede determinar utilizando cualquier número de criterios de valoración, que incluye los ensayos de proliferación. Los anticuerpos anti-GM-CSF se pueden evaluar utilizando cualquier número de ensayos que evalúen la función de GM-CSF. Por ejemplo, se utilizan convenientemente los ensayos basados en células para la señalización del receptor de GM-CSF, tal como los ensayos que determinan la velocidad de proliferación de una línea celular dependiente de GM-CSF en respuesta a una cantidad límite de GM-CSF. La línea celular TF-1 humana es adecuada para uso en tal ensayo. Véase, Krinner *et al.*, (2007) *Mol. Immunol.* Un anticuerpo que se administra para tratar una enfermedad para la cual es deseable inhibir el GM-CSF, preferiblemente retiene al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 75%, 80%, 90%, 95% o 100% de la actividad antagonista del anticuerpo quimérico c19/2, *p. ej.*, el documento WO03/068920, que tiene las regiones variables del anticuerpo monoclonal de ratón LMM102 y las CDR, según se define por Kabat:

CDRH1	DYNIH
CDRH2	YIAPYSGGTGYNQEFKN
CDRH3	RDRFPYYFDY
CDRL1	KASQNVGSNVA
CDRL2	SASYRSG
CDRL3	QQFNRSPLT.

5 Se puede identificar un anticuerpo de alta afinidad utilizando ensayos bien conocidos para determinar la actividad de unión y la afinidad. Tales técnicas incluyen ensayos de ELISA así como determinaciones de unión que emplean resonancia de plasmón de superficie o interferometría. Por ejemplo, las afinidades se pueden determinar mediante la interferometría de biocapa utilizando un biosensor Octet de ForteBio (Mountain View, CA). Un anticuerpo de la invención se une típicamente con afinidad similar tanto a la forma glicosilada como a la forma no glicosilada de GM-CSF.

10 Los anticuerpos de la invención compiten con c19/2 para unirse a GM-CSF. La capacidad de un anticuerpo descrito en la presente memoria para bloquear o competir con c19/2 para unirse a GM-CSF indica que el anticuerpo se une al mismo epítipo de c19/2 o a un epítipo que está cerca, *p. ej.*, superpuesto, con el epítipo que se une mediante c19/2. En otras realizaciones, un anticuerpo descrito en la presente memoria, *p. ej.*, un anticuerpo que comprende una combinación de regiones V_H y V_L como se muestra en la tabla proporcionada en la Figura 1, se puede utilizar como un anticuerpo de referencia para evaluar si otro anticuerpo compite por unirse al GM-CSF. Se considera que un anticuerpo de ensayo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia, si la unión del anticuerpo de referencia al antígeno se reduce en al menos 30%, generalmente al menos aproximadamente 40%, 50%, 60% o 75%, y con frecuencia por al menos aproximadamente 90%, en presencia del anticuerpo de ensayo. Se pueden emplear muchos ensayos para evaluar la unión, incluyendo ELISA, así como otros ensayos, tales como inmunotransferencias.

20 Los métodos para el aislamiento de anticuerpos con secuencias de la región V cerca de las secuencias de la línea germinal humana se han descrito previamente (solicitud de patente de EE. UU. N° de publicación 20050255552 y 20060134098). Las colecciones de anticuerpos se pueden expresar en una célula hospedadora adecuada que incluye células de mamífero, células de levadura o células procariotas. Para la expresión en algunos sistemas celulares, se puede introducir un péptido señal en el extremo N para dirigir la secreción al medio extracelular. Los anticuerpos se pueden secretar a partir de células bacterianas tales como *E. coli* con o sin un péptido señal. Los métodos para la secreción sin señal de fragmentos de anticuerpos de *E. coli* se describen en la solicitud de patente de EE.UU. 20070020685.

25 Para generar un anticuerpo de unión a GM-CSF, una de las regiones V_H, *p. ej.*, VH#5 mostrada en la Figura 1, se combina con una de las regiones V_L, *p. ej.*, VK#2 mostrada en la Figura 1, y se expresa en cualquiera de una serie de formatos en un sistema de expresión adecuado. Por lo tanto, el anticuerpo se puede expresar como scFv, Fab, Fab' (que contiene una secuencia bisagra de inmunoglobulina), F(ab')₂, (formado por la formación de enlaces di-sulfuro entre las secuencias bisagra de dos moléculas de Fab'), inmunoglobulina completa o inmunoglobulina truncada o como una proteína de fusión en una célula hospedadora procariota o eucariota, ya sea dentro de la célula hospedadora o por secreción. Un resto de metionina puede estar presente opcionalmente en el extremo N, por ejemplo, en polipéptidos producidos en sistemas de expresión sin señal. Como se describe en la presente memoria, cada una de las regiones V_H descritas en la presente memoria se puede emparejar con cada una de las regiones V_L para generar un anticuerpo anti-GM-CSF. En la tabla de la Figura 1 se muestran combinaciones ilustrativas de cadenas pesadas y ligeras.

30 Los anticuerpos de la invención inhiben la activación del receptor de GM-CSF, *p. ej.*, inhibiendo la unión de GM-CSF al receptor, y muestran una unión de alta afinidad a GM-CSF, *p. ej.*, 500 pM. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una constante de disociación de aproximadamente 10⁻⁴ por segundo o menos. Para no limitarse a la teoría, un anticuerpo con una constante de disociación más lenta proporciona un beneficio terapéutico mejorado. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención que tiene una constante de disociación tres veces más lenta que c19/2, produjo una actividad neutralizadora de GM-CSF 10 veces más potente, *p. ej.*, en un ensayo basado en células tal como la producción de IL-8. (véase, *p. ej.*, Ejemplo 2).

35 Los anticuerpos se pueden producir utilizando cualquier número de sistemas de expresión, que incluyen los sistemas de expresión tanto procariotas como eucariotas. En algunas realizaciones, el sistema de expresión es una expresión de células de mamífero, tal como un sistema de expresión de células CHO. Muchos de tales sistemas están ampliamente disponibles en proveedores comerciales. En realizaciones en las que un anticuerpo comprende tanto una región V_H como V_L, las regiones V_H y V_L se pueden expresar utilizando un único vector, *p. ej.*, en una unidad de expresión dicistrónica, o bajo el control de diferentes promotores. En otras realizaciones, la región V_H y V_L se puede expresar utilizando vectores separados. Una región V_H o V_L como se describe en la presente memoria puede comprender opcionalmente una metionina en el extremo N.

40 Un anticuerpo de la invención se puede producir en cualquier número de formatos, incluyendo como un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un scFv o un dAB. Un anticuerpo de la invención también puede incluir una región constante humana. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda humana. La región constante

55

de la cadena pesada es a menudo una región constante de la cadena gamma, por ejemplo, una región constante gamma-1, gamma-2, gamma-3 o gamma-4. En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser una IgA.

5 En algunas realizaciones de la invención, la región V_L del anticuerpo, VK#2, de la Figura 1, se combina con una región constante kappa humana (*p. ej.*, SEQ ID NO:10) para formar la cadena ligera completa.

10 En algunas realizaciones de la invención, la región V_H se combina con una región constante gamma-1 humana. Se puede elegir cualquier alotipo f gamma-1 adecuado, tal como el alotipo f. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo es una IgG que tiene una región constante de alotipo f, *p. ej.*, SEQ ID NO:11, que tiene una V_H de VH#5 (Figura 1). El anticuerpo tiene una V_L de VK#2 (Figura 1). En realizaciones particulares, el anticuerpo tiene una región constante kappa como se expone en la SEQ ID NO:10, y una región constante de la cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO:11, donde las regiones variables de la cadena pesada y ligera comprenden VH#5 y VK#2.

15 En algunas realizaciones, *p. ej.*, cuando el anticuerpo es un fragmento, el anticuerpo se puede conjugar con otra molécula, *p. ej.*, polietilenglicol (PEGilación) o albúmina sérica, para proporcionar una vida media extendida *in vivo*. Se proporcionan ejemplos de PEGilación de fragmentos de anticuerpos en Knight *et al. Plaelets* 15:409, 2004 (para abciximab); Pedley *et al., Br. J. Cancer* 70:1126, 1994 (para un anticuerpo anti-CEA); Chapman *et al., Nature Biotech.* 17:780, 1999; y Humphreys, *et al., Protein Eng. Des.* 20: 227,2007).

20 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención están en forma de un fragmento Fab'. Se genera una cadena ligera de longitud completa mediante la fusión de una región V_L a la región constante kappa o lambda humana. Cualquiera de las regiones constantes se puede utilizar para cualquier cadena ligera; sin embargo, en realizaciones típicas, una región constante kappa se utiliza en combinación con una región variable V_kappa y una región constante lambda se utiliza con una región variable V_lambda .

25 La cadena pesada del Fab' es un fragmento Fd' generado por la fusión de una región V_H de la invención con las secuencias de la región constante de la cadena pesada humana, el primer dominio constante (CH1) y la región bisagra. Las secuencias de la región constante de la cadena pesada pueden ser de cualquiera de las clases de inmunoglobulina, pero a menudo son de una IgG, y pueden ser de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos Fab' de la invención también pueden ser secuencias híbridas, *p. ej.*, una secuencia bisagra puede ser de una subclase de inmunoglobulina y el dominio CH1 puede ser de una subclase diferente.

V. Anticuerpos anti-GM-CSF para uso en el tratamiento de enfermedades en las que GM-CSF es un objetivo.

30 La invención también proporciona los anticuerpos anti-GM-CSF de la invención para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad que involucra GM-CSF en la que es deseable inhibir la actividad de GM-CSF, es decir, en la que GM-CSF es un objetivo terapéutico. En algunas realizaciones, dicho paciente tiene una enfermedad inflamatoria crónica, *p. ej.*, artritis, *p. ej.*, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil y otras enfermedades inflamatorias de la articulación; enfermedades inflamatorias intestinales, *p. ej.*, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome de Barrett, ileitis, enteritis y enteropatía sensible al gluten; trastornos inflamatorios del sistema respiratorio, tal como asma, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, rinitis alérgica, silicosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades pulmonares hipersensibles, bronquiectasia; enfermedades inflamatorias de la piel, que incluyen psoriasis, esclerodermia y dermatosis inflamatorias tal como eccema, dermatitis atópica, urticaria y prurito; trastornos relacionados con la inflamación del sistema nervioso central y periférico, que incluye esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Alzheimer. Se pueden tratar varias enfermedades inflamatorias utilizando los anticuerpos de la invención. Estas incluyen el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario, *p. ej.*, la glomerulonefritis y las espondiloartropatías; y enfermedades con un componente inflamatorio crónico indeseable, tal como esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias idiopáticas, síndrome de Sjogren, vasculitis, sarcoidosis, tiroiditis, gota, otitis, conjuntivitis, sinusitis, sarcoidosis, síndrome de Behcet, enfermedades hepato biliares, tal como hepatitis, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante. En algunas realizaciones, el paciente tiene inflamación después de una lesión en el sistema cardiovascular. Otras enfermedades inflamatorias incluyen tuberculosis y colecistitis crónica. Se describen enfermedades inflamatorias crónicas adicionales, *p. ej.*, en Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th edition, Wilson, et al., eds., McGraw-Hill, Inc.). En algunas realizaciones, un paciente tratado con un anticuerpo tiene un cáncer en el que el GM-CSF contribuye al crecimiento de células tumorales o cancerosas, *p. ej.*, leucemia mieloide aguda. En algunas realizaciones, un paciente tratado con un anticuerpo de la invención tiene, o está en riesgo de insuficiencia cardíaca, *p. ej.*, debido a una lesión isquémica del sistema cardiovascular tal como cardiopatía isquémica, apoplejía y aterosclerosis. En algunas realizaciones, un paciente tratado con un anticuerpo de la invención tiene asma. En algunas realizaciones, un paciente tratado con un anticuerpo de la invención tiene la enfermedad de Alzheimer. En algunas realizaciones, un paciente tratado con un anticuerpo de la invención tiene osteopenia, *p. ej.*, osteoporosis. En algunas realizaciones, un paciente tratado con un anticuerpo de la invención tiene púrpura trombocitopénica. En algunas realizaciones, el paciente tiene diabetes tipo I o tipo II. En algunas realizaciones, un paciente puede tener más de una enfermedad en la que GM-CSF es un objetivo terapéutico, *p. ej.*, un paciente puede tener artritis reumatoide e insuficiencia cardíaca, u osteoporosis y artritis reumatoide, etc.

60 El anticuerpo anti-GM-CSF se puede administrar como una composición farmacéutica a un paciente en una cantidad

terapéuticamente eficaz utilizando una pauta posológica adecuada para el tratamiento de la enfermedad. La composición se puede formular para utilizar en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Uno o más excipientes o vehículos fisiológicamente aceptables también se pueden incluir en las composiciones para una formulación adecuada. Las formulaciones adecuadas para uso en la presente invención se encuentran en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

El anticuerpo anti-GM-CSF se proporciona en una solución adecuada para inyección en el paciente, como una solución inyectable isotónica estéril. El anticuerpo se disuelve o suspende en una concentración adecuada en un vehículo aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo es acuoso, p. ej., agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato y similares. Las composiciones pueden contener sustancias farmacéuticas auxiliares según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un paciente, p. ej., un paciente que tiene osteopenia, asma, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, polimiositis, lupus sistémico eritematoso, insuficiencia cardíaca, daño cardíaco, p. ej., después de un ataque cardíaco, púrpura trombocitopénica, o diabetes, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad o los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Una dosis terapéuticamente efectiva se determina monitorizando la respuesta de un paciente a la terapia. Los valores de referencia típicos indicativos de una dosis terapéuticamente eficaz incluyen la mejora de los síntomas de la enfermedad en el paciente. Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente, incluyendo otros factores como la edad, el peso, el sexo, la vía de administración, etc. Se pueden administrar administraciones únicas o múltiples del anticuerpo dependiendo de la dosis y la frecuencia según lo requiera y tolere el paciente. En cualquier caso, las composiciones proporcionan una cantidad suficiente de anticuerpo anti-GM-CSF para tratar eficazmente al paciente.

El anticuerpo se puede administrar solo o en combinación con otras terapias para tratar la enfermedad de interés.

El anticuerpo se puede administrar mediante inyección o infusión a través de cualquier vía adecuada, que incluye, pero no se limita a, las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. En algunas realizaciones, el anticuerpo se puede administrar mediante insuflación. En una realización ilustrativa, el anticuerpo se puede almacenar a una concentración de 10 mg/ml en solución salina acuosa isotónica estéril para inyección a una temperatura de 4°C y se diluye en 100 ml o 200 ml de cloruro de sodio al 0.9% para inyección antes de la administración al paciente. El anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa en el transcurso de 1 hora a una dosis de entre 0.2 y 10 mg/kg. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa durante un período de entre 15 minutos y 2 horas. En otras realizaciones, el procedimiento de administración es a través de inyección subcutánea en bolo.

La dosis de anticuerpo se elige para proporcionar una terapia eficaz para el paciente y está en el intervalo de menos de 0.1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal o en el intervalo de 1 mg a 2 g por paciente. Preferiblemente, la dosis está en el intervalo de 1-10 mg/kg o aproximadamente 50 mg-1000 mg/paciente. La dosis se puede repetir a una frecuencia apropiada que puede estar en el intervalo de una vez por día a una vez cada tres meses, dependiendo de la farmacocinética del anticuerpo (p. ej., la vida media del anticuerpo en la circulación) y la respuesta farmacodinámica (p. ej., la duración del efecto terapéutico del anticuerpo). En algunas realizaciones, la vida media *in vivo* de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 25 días y la administración de anticuerpos se repite entre una vez por semana y una vez cada 3 meses. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra aproximadamente una vez al mes.

Un anticuerpo de la invención también se puede utilizar para fines de diagnóstico. Por ejemplo, el anticuerpo se puede utilizar para análisis clínicos, como la detección de los niveles de GM-CSF en un paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1. Identificación de regiones V anti-GM-CSF humanas modificadas.

La humanización se realizó como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. Nº de publicación 20050255552. Las colecciones enfocadas a epítomos se construyeron a partir de secuencias de colecciones del segmento V humano unidas a una región CDR3-FR4 que contiene secuencias de BSD en CDRH3 y CDRL3 junto con secuencias del segmento J de la línea germinal humana. Para la cadena pesada, se utilizó la secuencia de JH4 de la línea germinal humana y para la cadena ligera, se utilizó la secuencia de JK4 de la línea germinal humana.

Se seleccionaron regiones V humanizadas por ingeniería genética de longitud completa de una colección restringida en Vh1 que permitían la unión al GM-CSF humano recombinante. La colección V-kappa de "longitud completa" se utilizó como base para la construcción de colecciones de "casete" como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. nº de publicación 20060134098, en la que solo una parte del segmento V de c19/2 murino se reemplazó inicialmente por una colección de secuencias humanas. Se construyeron dos tipos de casetes. Los casetes para las cadenas V-kappa se hicieron mediante PCR de puente con secuencias comunes superpuestas dentro de la región marco 2. De esta manera, se construyeron colecciones de casetes humanos de la "parte frontal" y la "parte central"

para el isotipo V-kappa III humano. Los casetes V-kappa III humanos que permitían la unión a GM-CSF se identificaron mediante un ensayo de unión de transferencia de colonias y se clasificaron según la afinidad en ELISA. Los casetes de la "parte frontal" y la "parte central" humanos de V-kappa se fusionaron mediante PCR de puente para reconstruir una región V-kappa completamente humana que permitía la actividad de unión de GM-CSF. Por lo tanto, los Fab humanizados por ingeniería genética consisten en regiones V-kappa y V-pesada humanizadas por ingeniería genética que permitían la unión al GM-CSF humano.

La actividad de unión se determinó mediante análisis de resonancia de plasmón superficial (spr, por sus siglas en inglés). El GM-CSF biotinilado se capturó en un chip biosensor CM5 recubierto con estreptavidina. Los fragmentos Fab humanizados por ingeniería genética expresados a partir de *E. coli* se diluyeron a una concentración inicial de 30 nM en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 0.1 mg/ml y P20 al 0.005% a pH 7.4. Cada Fab se diluyó 4 veces utilizando una serie de dilución de 3 veces y cada concentración se ensayó dos veces a una temperatura de 37°C para determinar la cinética de unión con las superficies de antígenos de diferente densidad. Los datos de las tres superficies se ajustaron globalmente para extraer las constantes de disociación.

En la Figura 1 se muestran varias regiones V de anti-GM-CSF humanizado por ingeniería genética.

Ejemplo 2. Evaluación de un anticuerpo GM-CSF humanizado por ingeniería genética

Este ejemplo evalúa la actividad de unión y la potencia biológica de un anticuerpo anti-GM-CSF humanizado por ingeniería genética en un ensayo basado en células en comparación con un anticuerpo IgG1k quimérico (Ab2) que tiene regiones variables del anticuerpo de ratón LMM102 (Nice *et al.*, *Growth Factors* 3:159, 1990). Ab1 es un anticuerpo IgG1k humanizado por ingeniería genética contra GM-CSF que tiene regiones constantes idénticas a Ab2.

Análisis de resonancia de plasmón de superficie de unión de GM-CSF humano a Ab1 y Ab2

Se utilizó el análisis de resonancia de plasmón de superficie para comparar las cinéticas de unión y las afinidades monovalentes para la interacción de Ab1 y Ab2 con GM-CSF humano glicosilado utilizando un instrumento Biacore 3000. Ab1 o Ab2 se capturó en la superficie del chip Biacore utilizando F(ab')₂ policlonal anti-humano. Se utilizó como analito el GM-CSF humano recombinante glicosilado expresado a partir de células 293 humanas. Las constantes cinéticas se determinaron en 2 experimentos independientes (véase Figura 2 y Tabla 1). Los resultados muestran que GM-CSF se unió a Ab2 y Ab1 con afinidad monovalente comparable en este experimento. Sin embargo, Ab1 tenía una "constante de afinidad" dos veces más lenta que Ab2, pero una "constante de disociación" que era aproximadamente tres veces más lenta.

Tabla 1: Constantes cinéticas a una temperatura de 37°C determinada a partir del análisis de resonancia de plasmón de superficie en la Figura 2; se muestran constante de asociación (K_a), constante de disociación (K_d) y afinidad calculada (KD).

	K _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	KD (pM)
Ab2	7.20 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁻⁵	30.5
Ab1	2.86 x 10 ⁵	7.20 x 10 ⁻⁶	25.1

El GM-CSF está glicosilado de forma natural en los sitios de glicosilación tanto unidos a N como unidos a O, aunque la glicosilación no es necesaria para la actividad biológica. Con el fin de determinar si la glicosilación de GM-CSF afecta la unión de Ab1 o Ab2, los anticuerpos se compararon en un ELISA utilizando GM-CSF recombinante a partir de dos fuentes diferentes; GM-CSF expresado en *E. coli* (no glicosilado) y GM-CSF expresado a partir de células 293 humanas (glicosiladas). Los resultados en la Figura 3 y la Tabla 2 mostraron que ambos anticuerpos se unían al GM-CSF glicosilado y no glicosilado con actividades equivalentes. Los dos anticuerpos también demostraron valores de EC₅₀ comparables en este ensayo.

Tabla 2. Resumen de EC₅₀ para la unión de Ab2 y Ab1 a GM-CSF humano de dos fuentes diferentes determinadas mediante ELISA. La unión a GM-CSF recombinante de células 293 humanas (glicosiladas) o de *E. coli* (no glicosiladas) se determinó a partir de dos experimentos independientes. El experimento 1 se muestra en la Figura 5.

	No glicosilado (exp 1)	No glicosilado (exp 2)	Glicosilado (exp 1)
Ab2	400 pM	433 pM	387 pM
Ab1	373 pM	440 pM	413 pM

Ab1 es un anticuerpo humanizado por ingeniería genética que se obtuvo a partir de las regiones variables de ratón presentes en Ab2. Se analizó Ab1 para determinar la especificidad de epítipo superpuesto (Ab2) mediante ELISA de

5 competición. El Ab2 biotinilado se preparó utilizando técnicas conocidas. La biotinilación no afectó la unión de Ab2 a GM-CSF según lo determinado mediante ELISA. En el ensayo, se añadió Ab2 o Ab1 en concentraciones variables con una cantidad fija de Ab2 biotinilado. La detección de Ab2 biotinilado se ensayó en presencia de un competidor Ab o Ab1 sin marcar (Figura 4). Tanto Ab1 como Ab2 compitieron con el Ab2 biotinilado por la unión a GM-CSF, indicando así la unión al mismo epítipo. Ab1 compitió más eficazmente por la unión a GM-CSF que Ab2, lo que concuerda con la cinética de disociación más lenta para Ab1 en comparación con Ab2 mediante el análisis de resonancia de plasmón de superficie.

Neutralización de la actividad de GM-CSF mediante Ab1 y Ab2

10 Se empleó un ensayo basado en células para la neutralización de la actividad de GM-CSF para evaluar la potencia biológica. El ensayo mide la secreción de IL-8 de células U937 inducidas con GM-CSF. La IL-8 secretada en el sobrenadante del cultivo se determina mediante ELISA después de 16 horas de inducción con 0.5 ng/ml de GM-CSF derivado de *E. coli*.

15 Una comparación de la actividad neutralizadora de Ab1 y Ab2 en este ensayo se muestra en un ensayo representativo en la Figura 5. En tres experimentos independientes, Ab1 inhibió la actividad de GM-CSF más eficazmente que Ab2 al comparar la IC50 (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de IC50 para la inhibición de la expresión de IL-8 inducida por GM-CSF. Los datos de tres experimentos independientes mostrados en la Figura 5 y la IC50 media se expresan en ng/ml y nM.

Experimento	Ab2 (ng/ml)	Ab2 (nM)	Ab1 (ng/ml)	Ab1 (nM)
A	363	2.4	31.3	0.21
B	514	3.4	92.5	0.62
C	343	2.2	20.7	0.14
Media	407	2.7	48.2	0.32

20 Compendio de la invención

El Ab1 humanizado por ingeniería genética unido a GM-CSF con una constante de unión de equilibrio (KD) calculada de 25 pM. Ab2 unido a GM-CSF con un KD de 30.5 pM. Ab2 mostró una constante de asociación dos veces mayor (ka) que Ab1 para GM-CSF, mientras que Ab1 mostró cinéticas de disociación tres veces más lentas (kd) que Ab2. Ab2 y Ab1 mostraron una actividad de unión similar para el GM-CSF glicosilado y no glicosilado en un ELISA de unión a antígeno. Un ELISA de competición confirmó que ambos anticuerpos compitieron por el mismo epítipo; Ab1 mostró mayor actividad de unión competitiva que Ab2. Además, Ab1 mostró mayor actividad de neutralización de GM-CSF que Ab2 en un ensayo de inducción de IL-8 inducido por GM-CSF.

Secuencias de la región VH de anticuerpos anti-GM-CSF de la invención:

SEQ ID NO:5 (VH#5, Figura 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTNYYIHWVRQAPGQRLEWMGWINAG
 NGNTKYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRRQRFPPYYFDYWG
 30 QGTLVTVSS

Otras secuencias de la región VH descritas de anticuerpos anti-GM-CSF:

SEQ ID NO:1 (VH#1, Figura 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPN
 SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCVRRDRFPYYFDYWG
 GQGTTLVTVSS

SEQ ID NO:2 (VH#2, Figura 1)

QVQFVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTNYYIHWVRQAPGQRFQEWGMGWINAG
 NGNTKYSQKFQGRVAITRDTSASTAYMEFSSFRSEDTAVYYCARRDRFPYYFDYWG
 35 QGTFVTVSS

SEQ ID NO:3 (VH#3, Figura 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTNYYIHWVRQAPGQRLEWMGWINAG
NGNTKYSQKFQGRVAITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRQRFPPYFDYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO:4 (VH#4, Figura 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTNYYIHWVRQAPGQRLEWMGWINAG
NGNTKYSQKFQGRVAITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRRQRFPPYFDYWG
5 QGTLVTVSS

Secuencias de la región V_L de anticuerpos anti-GM-CSF de la invención:

SEQ ID NO:7 (VK#2, Figura 1)

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTNVAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGI
TDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNKSPLTFGGGTKVEIK

Otras secuencias de la región V_L descritas de anticuerpos anti-GM-CSF:

10 SEQ ID NO:6 (VK#1, Figura 1)

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTNVAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGI
TDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNRSPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:8 (VK#3, Figura 1)

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSNLAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIT
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNRSPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:9 (VK#4, Figura 1)

15 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSNLAWYQQKPGQAPRVLIYSTSSRATGIT
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQFNKSPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:10 Región constante kappa ilustrativa

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:11 Región constante ilustrativa de cadena pesada, f-alotipo:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
20 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-GM-CSF, que comprende:
 - (a) una región V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; y
 - 5 (b) una región V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
2. El anticuerpo anti-GM-CSF de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es una IgG.
3. El anticuerpo anti-GM-CSF de la reivindicación 1 ó 2, en donde el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:11 y una región constante de la cadena ligera kappa que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:10.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-GM-CSF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un anticuerpo anti-GM-CSF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso como medicamento.
6. Un anticuerpo anti-GM-CSF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria crónica.
- 15 7. Un anticuerpo anti-GM-CSF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento de un paciente que tiene osteopenia, artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, púrpura trombocitopénica idiopática, insuficiencia cardíaca, daño cardíaco debido a un evento isquémico o diabetes.

FIGURA 1

VH1 1-02 QVQLVQSGAEVKKPKQASVKVSKCKASGYTFGYYNHVWVROAPGQGLEHWGWIINPNSGITNVAOKPQGRVWTRDTSISTAYMELSRLSRSDDTAVVYCAR-----
 VH#1 QVQLVQSGAEVKKPKQASVKVSKCKASGYTFGYYNHVWVROAPGQGLEHWGNIINPNSGITNVAOKPQGRVWTRDTSISTAYMELSRLSRSDDTAVVYCVREDRFFYYFDYWGQCTLVTVSS

VH1 1-03 QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKCKASGYTFGYYNHVWVROAPGORLENWCIINAGNNTKYSQKPGQRVTIITRDTASASTAYMELSSLRSDTAVVYCAR-----
 VH#2 QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKCKASGYTFGYYNHVWVROAPGQGLEHWGWIINAGNNTKYSQKPGQRVAITRDTASASTAYMELSSLRSDTAVVYCARRRDRFFYYFDYWGQCTLVTVSS
 VH#3 QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKCKASGYTFGYYNHVWVROAPGQRLRWGKIINAGNNTKYSQKPGQRVAITRDTASASTAYMELSSLRSDTAVVYCARRRDRFFYYFDYWGQCTLVTVSS
 VH#4 QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKCKASGYTFGYYNHVWVROAPGORLENWCIINAGNNTKYSQKPGQRVAITRDTASASTAYMELSSLRSDTAVVYCVRRQRPFFYYFDYWGQCTLVTVSS
 VH#5 QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKCKASGYTFGYYNHVWVROAPGORLENWGIINAGNNTKYSQKPGQRVTIITRDTASASTAYMELSSLRSDTAVVYCVRRQRPFFYYFDYWGQCTLVTVSS

VKIII A27 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKQAPRLLIYQASRRATGIIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSSP-----
 VK#1 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTN--VAMYQQKPKGQAPRVLLIYSTISSRATGIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQPFRESPLTFGGGTKVEIK
 VK#2 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVGTN--VAMYQQKPKGQAPRVLLIYSTISSRATGIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQPFNKSPLTFGGGTKVEIK
 VK#3 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSN--LAWYQQKPKGQAPRVLLIYSTISSRATGIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQPFNRESPLTFGGGTKVEIK
 VK#4 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGSN--LAWYQQKPKGQAPRVLLIYSTISSRATGIDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQPFNKSPLTFGGGTKVEIK

Fab	Vh	Vk	Velocidad de disociación para la unión a GM-CSF determinada por análisis de resonancia de plasmón de superficie (s-1)
FB42-8	#2	#3	1.36×10^{-4}
FB44-5	#1	#3	8.0×10^{-5}
FB77-2	#3	#1	5.57×10^{-5}
FB92-1	#4	#4	3.84×10^{-5}
FB94-1	#4	#2	3.12×10^{-5}
FB104-1	#5	#1	3.57×10^{-5}
FB106-1	#5	#2	5.4×10^{-5}

Figura 2

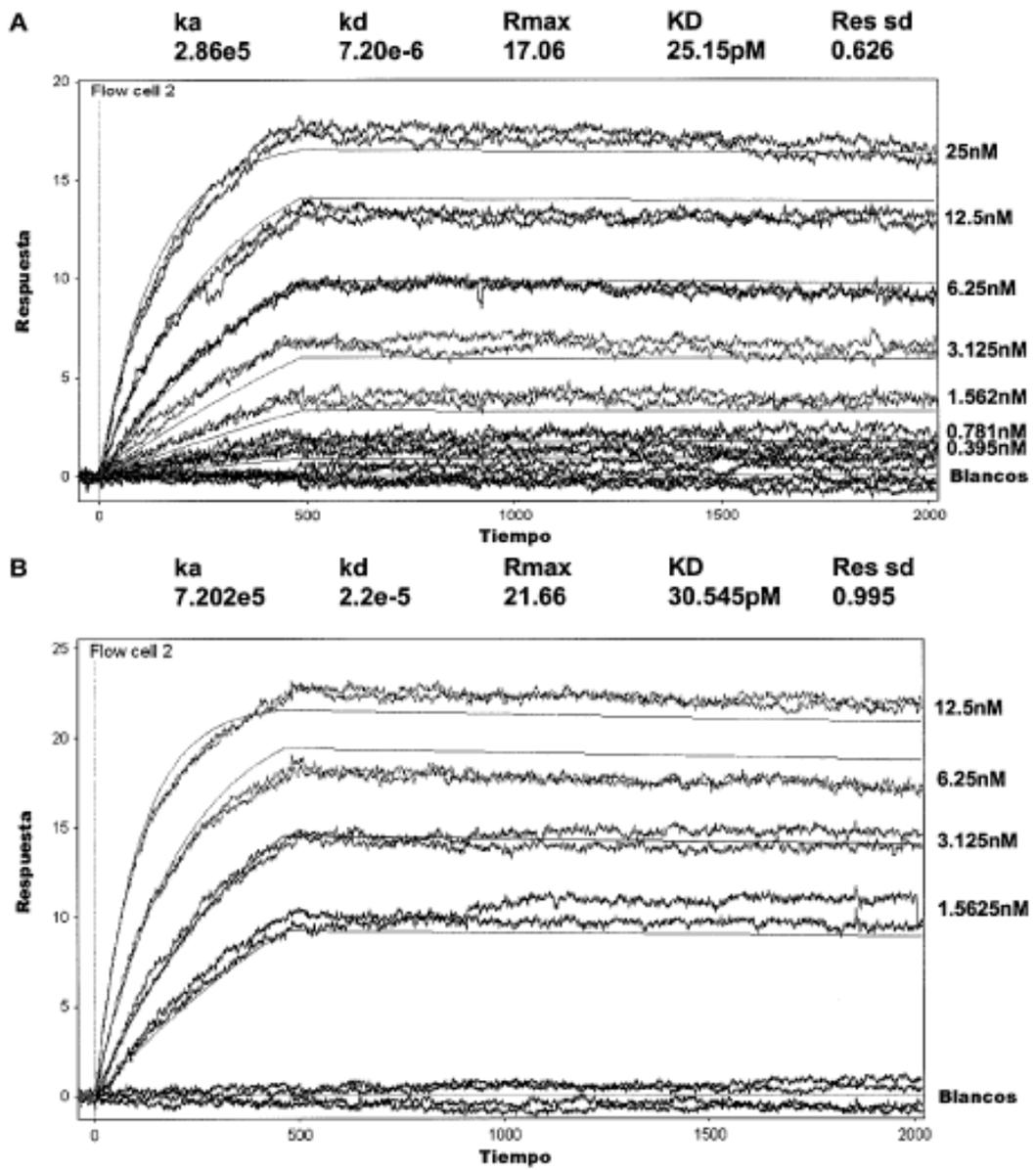


Figura 3

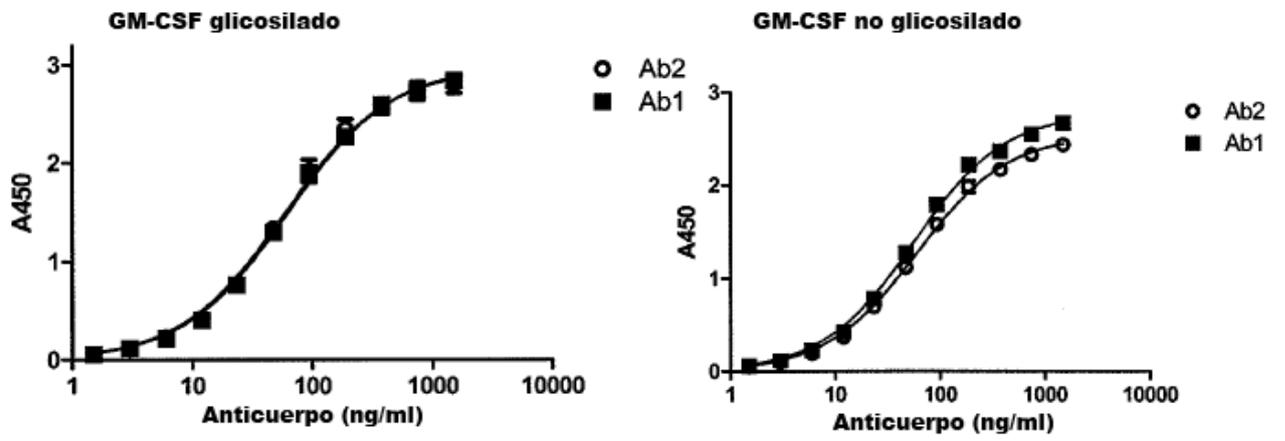


Figura 4

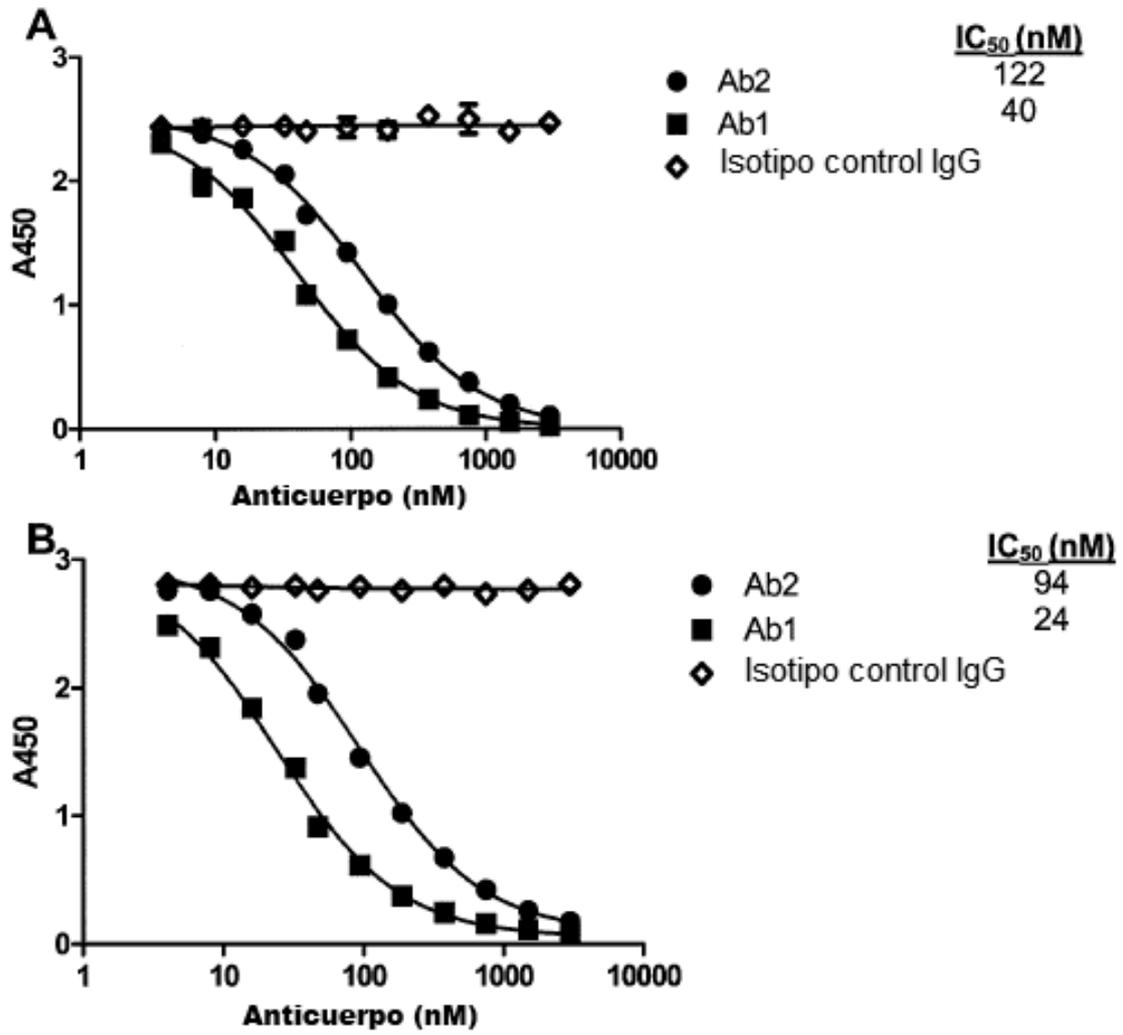


Figura 5

