

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 412**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2011 PCT/US2011/035231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11140249**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011 E 11778283 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2566517**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a CSF1R**

30 Prioridad:

04.05.2010 US 331177 P

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

28.03.2019

73 Titular/es:

**FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
111 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**WONG, JUSTIN y
VASQUEZ, MAXIMILIANO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 706 412 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 que se unen a CSF1R

5 Campo técnico

Se proporcionan anticuerpos que se unen a CSF1R. También se proporcionan cadenas pesadas y cadenas ligeras de anticuerpos que son capaces de formar anticuerpos que se unen a CSF1R. Además, se proporcionan anticuerpos, cadenas pesadas y cadenas ligeras que comprenden una o más regiones determinantes de complementariedad particulares (CDR). Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos para CSF1R. También se proporcionan polinucleótidos que codifican cadenas pesadas o cadenas ligeras de anticuerpos. Los anticuerpos para CSF1R se proporcionan para su uso en métodos de tratamiento, incluyendo, pero sin limitación, métodos para tratar artritis reumatoide, pérdida ósea y esclerosis múltiple.

15 Antecedentes

El receptor del factor 1 estimulante de colonias (denominado en el presente documento CSF1R; también denominado en la técnica FMS, FIM2, C-FMS y CD115) es un receptor transmembrana de un solo paso con un dominio extracelular N-terminal (ECD) y un dominio intracelular C-terminal con actividad tirosina quinasa. La unión del ligando de CSF1 o del ligando interleucina 34 (denominado en el presente documento como IL34; Lin et al., *Science* 320: 807-11 (2008)) a CSF1R conduce a la dimerización del receptor, a la regulación positiva de la actividad tirosina quinasa de la proteína CSF1R, a la fosforilación de los restos de tirosina de CSF1R y a eventos de señalización cadena abajo. Tanto CSF1 como IL34 estimulan la supervivencia, proliferación y diferenciación de monocitos en macrófagos.

Se ha encontrado que muchas células tumorales secretan CSF1, que activa las células de monocitos/macrófagos a través de CSF1R. Se ha demostrado que el nivel de CSF1 en tumores se correlaciona con el nivel de macrófagos asociados a tumores (TAM) en el tumor. Se ha encontrado que los niveles más altos de TAM se correlacionan con los peores pronósticos de los pacientes. Además, se ha encontrado que CSF1 promueve el crecimiento tumoral y la progresión a metástasis en, por ejemplo, xenoinjertos de cáncer de mama humano en ratones. Véase, por ejemplo, Paulus et al., *Cancer Res.* 66: 4349-56 (2006). Además, CSF1R parece desempeñar un papel en la destrucción osteolítica del hueso en la metástasis ósea, ya que una pequeña molécula inhibidora de la actividad tirosina quinasa del receptor suprime esa destrucción. Véase, por ejemplo, Ohno et al., *Mol. Cancer Ther.* 5: 2634-43 (2006).

También se ha encontrado que CSF1 y su receptor están involucrados en varias enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Véase, por ejemplo, Hamilton, *Nat. Rev.* 8: 533-44 (2008). Por ejemplo, se ha encontrado que las células endoteliales sinoviales de las articulaciones afectadas por artritis reumatoide producen CSF1, lo que sugiere un papel para CSF1 y su receptor en la enfermedad. El bloqueo de la actividad de CSF1R con un anticuerpo da como resultado efectos clínicos positivos en modelos de artritis en ratones, que incluyen una reducción en la destrucción de hueso y cartílago y una reducción en el número de macrófagos. Véase, por ejemplo, Kitaura et al., *J. Clin. Invest.* 115: 3418-3427 (2005).

Las células maduras diferenciadas de linaje mieloide, tales como los macrófagos, las células microgliales y los osteoclastos, contribuyen a la patología de diversas enfermedades, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y enfermedades de pérdida ósea. Las células de linaje mieloide diferenciadas derivan de intermediarios de monocitos de sangre periférica. La estimulación de CSF1R contribuye al desarrollo de monocitos a partir de los precursores de la médula ósea, a la proliferación y supervivencia de monocitos, y a la diferenciación de monocitos de sangre periférica en células de linaje mieloide diferenciadas tales como macrófagos, células microgliales y osteoclastos. La estimulación de CSF1R contribuye, de este modo, a la proliferación, supervivencia, activación y maduración de células de linaje mieloide diferenciadas, y en el entorno patológico, la estimulación de CSF1R contribuye a la capacidad de las células de linaje mieloide diferenciadas para mediar en la patología de la enfermedad.

El documento WO 2009/112245 divulga anticuerpos específicos para el CSF-1R, composiciones que comprenden dichos anticuerpos y métodos de tratamiento usando tales composiciones.

El documento WO 2009/026303 divulga proteínas de unión a antígeno que se unen a la proteína c-fms humana, junto con ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a antígeno, los vectores y las células que codifican la misma. Se afirma que las proteínas de unión a antígeno son capaces de inhibir la unión de c-fms a CSF-1, de reducir la migración de monocitos a tumores y de reducir la acumulación de macrófagos asociados a tumores.

Sherr et al. (1989) *Blood* 73 (7): 1786-1793 divulga la inhibición de la actividad de CSF-1 por anticuerpos monoclonales para el receptor de CSF-1 humano.

Tsuboi et al. (2000) *Leukemia* 14: 1460-1466 divulga un papel de la forma de la membrana del CSF-1 humano en la proliferación de células FDCP-Mix hematopoyéticas multipotentes que expresan CSF1R humano.

Los antagonistas adicionales de la señalización de CSF1R serían, por lo tanto, útiles en el tratamiento de diversas

enfermedades relacionadas con CSF1R, tales como cáncer, afecciones inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.

Sumario

5 Los presentes inventores han inventado un nuevo conjunto de anticuerpos, que incluye anticuerpos humanizados, dirigidos contra el dominio extracelular de CSF1R humano (CSF1R ECD). Se realizó una biblioteca de presentación en fagos Fab a partir de bazos de ratones que se inmunizaron con una proteína de fusión CSF1R ECD-Fc humana. Se aislaron 1056 clones de fagos que expresan Fab que se unen a CSF1R ECD-Fc a través de la selección de esta biblioteca. Cuando los 1056 Fab se expresaron como proteína purificada, se encontró que 668 se unían a CSF1R ECD. De esos 668 Fab de unión, solo 121 Fab bloquearon la unión de CSF1 y/o IL34 a CSF1R. Solo se encontraron 33 de esos Fab para bloquear la unión tanto de CSF1 como de IL34 a CSF1R. Tras la secuenciación, los 33 Fab representaron 19 conjuntos únicos de secuencias. Se eligieron once Fab con afinidad subnanomolar para CSF1R ECD humano para producir anticuerpos quiméricos para estudio adicional. Basándose en las afinidades de unión de CSF1R de mono cynomolgus y humano, el bloqueo de la unión de CSF1 e IL34 a CSF1R, y la inhibición de la fosforilación de CSF1R inducida por ligandos, se seleccionaron tres anticuerpos quiméricos para la humanización, y se hicieron dieciséis anticuerpos humanizados basados en esos tres anticuerpos quiméricos.

20 Catorce de los dieciséis anticuerpos humanizados retuvieron afinidades de unión subnanomolares para la CSF1R ECD humano. Véase, por ejemplo, Tabla 5. Estos anticuerpos humanizados bloquean la unión de los ligandos tanto CSF1 como IL34 a CSF1R humano, y muchos también bloquean la unión tanto de CSF1 como de IL34 a CSF1R de mono cynomolgus. Véase, por ejemplo, Tabla 4.

25 Para el desarrollo terapéutico de fármacos, es beneficioso tener anticuerpos que se unan tanto a antígenos humanos como de monos cynomolgus con similar afinidad. Los tres anticuerpos quiméricos elegidos para la humanización se seleccionaron en parte porque tenían afinidades de unión similares para la CSF1R ECD humano y de cynomolgus. La mayoría de las versiones humanizadas de uno de los anticuerpos quiméricos, 0302, sin embargo, perdieron afinidad de unión significativa para CSF1R ECD de mono cynomolgus durante la humanización, aunque mantuvieron una fuerte afinidad de unión a CSF1R ECD humano. Véase, por ejemplo, Tabla 3. Las versiones humanizadas de 0301 y 0311 retuvieron una unión igualmente fuerte para CSF1R ECD tanto humano como de mono cynomolgus, con diferencias de afinidad de unión para las dos especies de menos de aproximadamente 2 veces.

35 Basándose en las afinidades de unión a CSF1R, la inhibición del ligando y el potencial de inmunogenicidad, se seleccionaron tres anticuerpos humanizados para estudios adicionales. Los tres anticuerpos humanizados derivaron de los dos anticuerpos quiméricos que no perdieron significativamente la afinidad de unión a CSF1R de mono cynomolgus durante la humanización. Esos tres anticuerpos humanizados inhiben la fosforilación inducida por ligando de CSF1R humano, y también bloquean la proliferación inducida por ligando y las respuestas de supervivencia en monocitos humanos primarios. Véase, por ejemplo, Tablas 6 y 7 y Figuras 10 y 11. Por lo tanto, estos anticuerpos son útiles para tratar enfermedades que implican, por ejemplo, respuestas de proliferación y supervivencia inducidas por ligandos en monocitos humanos primarios.

45 El bloqueo de las respuestas inducidas por CSF1R con un anticuerpo anti-CSF1R debería inhibir la proliferación, supervivencia, activación, maduración de las células de linaje mieloide diferenciadas y atenuar su capacidad para mediar en la patología de la enfermedad. Además, el bloqueo de las respuestas inducidas por CSF1R con un anticuerpo anti-CSF1R debería inhibir la diferenciación de monocitos intermedios de sangre periférica en células de linaje mieloide diferenciadas, disminuyendo el número de células de linaje mieloide diferenciadas que median la patología.

50 Por consiguiente, los anticuerpos anti-CSF1R humanizados descritos en el presente documento se pueden usar para tratar enfermedades crónicas con síntomas existentes mediante la inhibición de la capacidad de las células de linaje mieloide diferenciadas para mediar en la patología de la enfermedad. Los anticuerpos humanizados también se pueden usar para tratar enfermedades crónicas que están recidivando y remitiendo en la naturaleza al inhibir el desarrollo de nuevas células de linaje mieloide mediadoras de patologías diferenciadas de los monocitos de sangre periférica durante la fase de remisión de la enfermedad, atenuando, de este modo, el número de y nueva formación de las células mediadoras de la patología.

La invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, como se define en las reivindicaciones, en donde el anticuerpo se une a CSF1R.

60 La siguiente descripción de realizaciones de estructuras de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras debe entenderse sujeta a las definiciones de la invención tal como se proporciona en las reivindicaciones.

65 En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45. En algunas realizaciones, la cadena ligera comprende una secuencia que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14

% o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 44 y una cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 51;

(q) una cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 44 y una cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 52;

(r) una cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 45 y una cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 51; o

(s) una cadena pesada que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 45 y una cadena ligera que comprende una secuencia que es al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 52.

En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el anticuerpo comprende: (a) una cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada (HC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 15, una CDR2 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 16 y una CDR3 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 17 y una cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera (LC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 20; (b) una cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada (HC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 21, una CDR2 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 22 y una CDR3 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 23 y una cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera (LC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 24, una CDR2 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una CDR3 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 26; o (c) una cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada (HC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 27, una CDR2 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 28 y una CDR3 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 29 y una cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera (LC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 30, una CDR2 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 31 y una CDR3 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el anticuerpo comprende: (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 60; (b) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 61; o (c) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 58 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 65. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el anticuerpo comprende: (a) una cadena pesada que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 60; (b) una cadena pesada que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 61; o (c) una cadena pesada que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 58 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 65.

En algunas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, un anticuerpo se selecciona de un Fab, un Fv, un scFv, un Fab' y un (Fab')₂. En algunas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, un anticuerpo se selecciona de una IgA, una IgG y una IgD. En algunas realizaciones, un anticuerpo es una IgG. En algunas realizaciones, un anticuerpo es una IgG4. En algunas realizaciones, un anticuerpo es una IgG4 que comprende una mutación S241P en al menos una región constante de cadena pesada de IgG4.

En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a CSF1R humano y/o se une a CSF1R de cynomolgus. En algunas realizaciones, un anticuerpo bloquea la unión del ligando a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo bloquea la unión de CSF1 y/o IL34 a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por ligando. En algunas realizaciones, un anticuerpo inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por CSF1 y/o IL34. En algunas realizaciones, un anticuerpo se une a CSF1R humano con una afinidad (K_D) de menos de 1 nM. En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe las respuestas de proliferación y/o supervivencia en presencia de CSF1 o IL34.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a CSF1R.

En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico aislado, en donde el ácido nucleico aislado comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada descrita anteriormente. En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado codifica una cadena ligera descrita anteriormente. En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado codifica una cadena pesada descrita anteriormente y una cadena ligera descrita anteriormente. En algunas realizaciones, se proporciona una composición, en donde la composición comprende un primer ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada descrita anteriormente, y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera descrita anteriormente. En algunas realizaciones, se proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o una composición descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula hospedadora eucariota. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero. En algunas

realizaciones, la célula eucariota se selecciona de una célula CHO, una célula 293, una célula NSO y una célula PER.C6. En algunas realizaciones, una célula hospedadora es una célula 293-6E o una célula DG44.

En algunas realizaciones, se divulgan métodos para tratar una enfermedad que comprenden administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a CSF1R. En algunas realizaciones, se divulga un método para tratar esclerosis múltiple que comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a CSF1R. En algunas realizaciones, se divulga un método para tratar artritis reumatoide que comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a CSF1R. En algunas realizaciones, se divulga un método para tratar pérdida ósea osteolítica que comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a CSF1R. En algunas realizaciones, la pérdida ósea osteolítica se selecciona entre osteoporosis, pérdida ósea osteolítica inducida por metástasis y pérdida ósea inducida por artritis reumatoide. En algunas realizaciones, se divulga un método para tratar cáncer que comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a CSF1R. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas, melanoma maligno uveal, linfoma folicular, carcinoma de células renales, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cerebro, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, melanoma, astrocitoma, cáncer de estómago y adenocarcinoma pulmonar.

En algunas realizaciones, se divulga un método para tratar una afección inflamatoria que comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se une a CSF1R.

En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a CSF1R y composiciones que comprenden anticuerpos que se unen a CSF1R para su uso en métodos de tratamiento de seres humanos o animales. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a CSF1R y composiciones que comprenden anticuerpos que se unen a CSF1R para su uso en un método para tratar la artritis reumatoide en un ser humano o animal. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a CSF1R y composiciones que comprenden anticuerpos que se unen a CSF1R para su uso en un método para tratar la esclerosis múltiple en un ser humano o animal. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a CSF1R y composiciones que comprenden anticuerpos que se unen a CSF1R para su uso en métodos de tratamiento de cáncer de un ser humano o animal. En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos que se unen a CSF1R y composiciones que comprenden anticuerpos que se unen a CSF1R para su uso en un método para tratar una afección inflamatoria en un ser humano o animal.

Breve descripción de las figuras

La **FIG. 1** muestra un alineamiento de las regiones variables de la cadena pesada humanizada para cada uno de los anticuerpos humanizados Ab1 a Ab16, como se analiza en el Ejemplo 4. Los restos en caja son aminoácidos en la secuencia del aceptor humano que se cambiaron de nuevo al correspondiente resto de ratón.

La **FIG. 2** muestra un alineamiento de las regiones variables de la cadena ligera humanizada para cada uno de los anticuerpos humanizados Ab1 a Ab16, como se analiza en el Ejemplo 4. Los aminoácidos en caja son restos en la secuencia del aceptor humano que se cambiaron de nuevo al correspondiente resto de ratón.

La **FIG. 3** muestra curvas de unión para ciertos anticuerpos humanizados que se unen a CSF1R ECD humano, como se describe en el Ejemplo 5. La Figura 3A muestra curvas de unión para los anticuerpos quiméricos parentales (cAb) 0301 y para los anticuerpos humanizados (huAb) 0301.1, 0301.2, 0302.3, 0301.4, 0301.5 y 0301.6 (h0301-L0H0, h0301-L0H1, h0301-L0H2, h0301-L1H0, h0301-L1H1 y h0301-L1H2, respectivamente). La Figura 3B muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0302 parental y humanizados (huAb) 0302.1, 0302.2, 0302.3, 0302.4, 0302.5 y 0302.6 (h0302-L0H1, h0302-L1H1, h0302-L2H1, h0302-L0H2, h0302-L1H2 y h0302-L2H2, respectivamente). La Figura 3C muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0311 parental y humanizados (huAb) 0311.1, 0311.2, 0311.3 y 0311.4 (h0311-L0H1, h0311-L1H1, h0311-L0H2 y h0311-L1H2, respectivamente).

La **FIG. 4** muestra curvas de unión para ciertos anticuerpos humanizados que se unen a CSF1R ECD de cynomolgus, como se describe en el Ejemplo 5. La Figura 4A muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0301 parental y humanizados (huAb) 0301.1, 0301.2, 0302.3, 0301.4, 0301.5 y 0301.6 (h0301-L0H0, h0301-L0H1, h0301-L0H2, h0301-L1H0, h0301-L1H1 y h0301-L1H2, respectivamente). La Figura 4B muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0302 parental y humanizados (huAb) 0302.1, 0302.2, 0302.3, 0302.4, 0302.5 y 0302.6 (h0302-L0H1, h0302-L1H1, h0302-L2H1, h0302-L0H2, h0302-L1H2 y h0302-L2H2, respectivamente). La Figura 4C muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0311 parental y humanizados (huAb) 0311.1, 0311.2, 0311.3 y 0311.4 (h0311-L0H1, h0311-L1H1, h0311-L0H2 y h0311-L1H2, respectivamente).

La **FIG. 5** muestra curvas de unión para ciertos anticuerpos humanizados que se unen a CSF1R ECD de ratón, como se describe en el Ejemplo 5. La Figura 5A muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0301 parental y humanizados (huAb) 0301.1, 0301.2, 0302.3, 0301.4, 0301.5 y 0301.6 (h0301-L0H0, h0301-L0H1, h0301-L0H2, h0301-L1H0, h0301-L1H1 y h0301-L1H2, respectivamente). La Figura 5B muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0302 parental y humanizados (huAb) 0302.1, 0302.2, 0302.3, 0302.4, 0302.5 y 0302.6 (h0302-L0H1, h0302-L1H1, h0302-L2H1, h0302-L0H2, h0302-L1H2 y h0302-L2H2, respectivamente). La Figura 5C muestra curvas de unión para anticuerpos cAb 0311 parental y humanizados (huAb) 0311.1, 0311.2, 0311.3 y 0311.4 (h0311-L0H1, h0311-L1H1, h0311-L0H2 y h0311-L1H2, respectivamente).

La **FIG. 6** muestra la inhibición de la fosforilación de CSF1R inducida por CSF1 por ciertos anticuerpos humanizados, como se describe en el Ejemplo 6. La Figura 6A muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0301 parental y humanizados (huAb) 0301.1, 0301.2, 0302.3, 0301.4, 0301.5 y 0301.6 (h0301-L0H0, h0301-L0H1, h0301-L0H2, h0301-L1H0, h0301-L1H1 y h0301-L1H2, respectivamente). La Figura 6B muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0302 parental y humanizados (huAb) 0302.1, 0302.2, 0302.3, 0302.4, 0302.5 y 0302.6 (h0302-L0H1, h0302-L1H1, h0302-L2H1, h0302-L0H2, h0302-L1H2 y h0302-L2H2, respectivamente). La Figura 6C muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0311 parental y humanizados (huAb) 0311.1, 0311.2, 0311.3 y 0311.4 (h0311-L0H1, h0311-L1H1, h0311-L0H2 y h0311-L1H2, respectivamente).

La **FIG. 7** muestra la inhibición de la fosforilación de CSF1R inducida por IL34 por ciertos anticuerpos humanizados, como se describe en el Ejemplo 6. La Figura 7A muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0301 parental y humanizados (huAb) 0301.1, 0301.2, 0302.3, 0301.4, 0301.5 y 0301.6 (h0301-L0H0, h0301-L0H1, h0301-L0H2, h0301-L1H0, h0301-L1H1 y h0301-L1H2, respectivamente). La Figura 7B muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0302 parental y humanizados (huAb) 0302.1, 0302.2, 0302.3, 0302.4, 0302.5 y 0302.6 (h0302-L0H1, h0302-L1H1, h0302-L2H1, h0302-L0H2, h0302-L1H2 y h0302-L2H2, respectivamente). La Figura 7C muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0311 parental y humanizados (huAb) 0311.1, 0311.2, 0311.3 y 0311.4 (h0311-L0H1, h0311-L1H1, h0311-L0H2 y h0311-L1H2, respectivamente).

La **FIG. 8** muestra el bloqueo de la unión de CSF1 humano a CSF1R ECD de cynomolgus por ciertos anticuerpos humanizados, como se describe en el Ejemplo 7. La Figura 8A muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0301 parental y humanizados (huAb) 0301.1, 0301.2, 0302.3, 0301.4, 0301.5 y 0301.6 (h0301-L0H0, h0301-L0H1, h0301-L0H2, h0301-L1H0, h0301-L1H1 y h0301-L1H2, respectivamente). La Figura 8B muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0302 parental y humanizados (huAb) 0302.1, 0302.2, 0302.3, 0302.4, 0302.5 y 0302.6 (h0302-L0H1, h0302-L1H1, h0302-L2H1, h0302-L0H2, h0302-L1H2 y h0302-L2H2, respectivamente). La Figura 8C muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0311 parental y humanizados (huAb) 0311.1, 0311.2, 0311.3 y 0311.4 (h0311-L0H1, h0311-L1H1, h0311-L0H2 y h0311-L1H2, respectivamente).

La **FIG. 9** muestra el bloqueo de la unión de IL34 humano a CSF1R ECD de cynomolgus por ciertos anticuerpos humanizados, como se describe en el Ejemplo 7. La Figura 9A muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0301 parental y humanizados (huAb) 0301.1, 0301.2, 0302.3, 0301.4, 0301.5 y 0301.6 (h0301-L0H0, h0301-L0H1, h0301-L0H2, h0301-L1H0, h0301-L1H1 y h0301-L1H2, respectivamente). La Figura 9B muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0302 parental y humanizados (huAb) 0302.1, 0302.2, 0302.3, 0302.4, 0302.5 y 0302.6 (h0302-L0H1, h0302-L1H1, h0302-L2H1, h0302-L0H2, h0302-L1H2 y h0302-L2H2, respectivamente). La Figura 9C muestra curvas de bloqueo para anticuerpos cAb 0311 parental y humanizados (huAb) 0311.1, 0311.2, 0311.3 y 0311.4 (h0311-L0H1, h0311-L1H1, h0311-L0H2 y h0311-L1H2, respectivamente).

La **FIG. 10** muestra el bloqueo de la fosforilación de CSF1R inducida por CSF1- (A) e IL34- (B) en células CHO que expresan CSF1R humano por los anticuerpos humanizados 0301-L0H0, 0301-L1H0 y 0311-L0H1, como se describe en el Ejemplo 9.

La **FIG. 11** muestra el bloqueo de las respuestas de proliferación/supervivencia de monocitos inducidos por CSF1- (A) e IL34- (B) por los anticuerpos humanizados 0301-L0H0, 0301-L1H0, y 0311-L0H1, como se describe en el Ejemplo 10.

Las **FIG. 12A-C** muestran que los anticuerpos humanizados 0301-L0H0, 0301-L1H0 y 0311-L0H1 no estimulan la proliferación o supervivencia de monocitos primarios, utilizando monocitos de tres donantes diferentes, como se describe en el Ejemplo 11.

Descripción detallada

Se divulgan métodos para tratar enfermedades que comprenden administrar nuevos anticuerpos para CSF1R. Todos los anticuerpos tienen afinidades de unión para CSF1R ECD humano de menos de 2 nM y todos menos dos de los anticuerpos humanizados tienen afinidades de unión subnanomolares para CSF1R ECD humano. Además, los nuevos anticuerpos bloquean la unión de CSF1 e IL34 a CSF1R humano e inhiben la fosforilación inducida por ligando de CSF1R humano. Muchos de los nuevos anticuerpos también bloquean la unión de CSF1 e IL34 a CSF1R de cynomolgus, lo que facilita los experimentos *in vivo* para apoyar el desarrollo de terapias con anticuerpos anti-CSF1R. Por lo tanto, los nuevos anticuerpos son adecuados para uso terapéutico en enfermedades humanas, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, enfermedades autoinmunitarias y afecciones inflamatorias.

Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Definiciones

Salvo que se defina de otro modo, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados comúnmente entendidos por los expertos en la materia. Además, a no ser que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán las pluralidades, y los términos en plural incluirán el singular.

Las técnicas a modo de ejemplo utilizadas en relación con el ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, el cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección), las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación son conocidas en la técnica. Se describen muchas de estas técnicas y procedimientos, por ejemplo, en Sambrook *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, N. Y. (1989)), entre otros lugares. Además, también se conocen en la técnica, técnicas a modo de ejemplo para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

5 En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. En el contexto de una reivindicación dependiente múltiple, el uso de "o" se refiere a más de una reivindicación precedente independiente o dependiente solamente como alternativa. También, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique lo contrario.

10 Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, se entenderán como que tienen los siguientes significados:

15 Las expresiones "**molécula de ácido nucleico**" y "**polinucleótido**" se pueden usar indistintamente y se refieren a un polímero de nucleótidos. Tales polímeros de nucleótidos pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales, e incluyen, pero sin limitación, ADN, ARN y APN. "**Secuencia de ácido nucleico**" se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos que comprende la molécula de ácido nucleico o polinucleótido.

20 Los términos "**polipéptido**" y "**proteína**" se usan indistintamente para referirse a un polímero de restos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Tales polímeros de restos de aminoácidos pueden contener restos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, pero sin limitación, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de restos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas se abarcan por definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares. Asimismo, a efectos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

30 El término "**CSF1R**" se refiere, en el presente documento, al CSF1R de longitud completa, que incluye el ECD N-terminal, el dominio transmembrana y el dominio tirosina quinasa intracelular, con o sin una secuencia líder N-terminal. En algunas realizaciones, el CSF1R es un CSF1R humano que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 o de la SEQ ID NO:2.

35 El término "**dominio extracelular de CSF1R**" ("**CSF1R ECD**"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de CSF1R que carece de los dominios intracelular y transmembrana. Los CSF1R ECD incluyen CSF1R ECD de longitud completa y los fragmentos de CSF1R ECD que son capaces de unirse a CSF1 y/o IL34. El CSF1R ECD de longitud completa humano se define en el presente documento como que comprende los aminoácidos 1 a 512 (es decir, que incluye la secuencia líder) o los aminoácidos 20 a 512 (es decir, que carece de la secuencia líder) de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, un fragmento de CSF1R ECD humano comprende los aminoácidos 20 a 506 de la SEQ ID NO: 2 (véase la SEQ ID NO: 5). En algunas realizaciones, un fragmento de CSF1R humano termina en el aminoácido 507, 508, 509, 510 o 511. En algunas realizaciones, un cynoCSF1R ECD comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 (con secuencia líder) o los aminoácidos 20 a 506 de la SEQ ID NO: 7 (sin secuencia líder).

50 El término "**anticuerpo**", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende al menos la región determinante de complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de una cadena pesada y al menos la CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera, en donde la molécula es capaz de unirse al antígeno. El término anticuerpo incluye, pero sin limitación, fragmentos que son capaces de unirse a antígenos, tales como Fv, Fv monocatenario (scFv), Fab, Fab 'y (Fab)' 2- El término anticuerpo también incluye, pero sin limitación, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos de varias especies tales como ratón, humanos, mono cynomolgus, etc.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende al menos una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada y al menos una porción de una región constante de cadena pesada, y al menos una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera y al menos una porción de una región constante de cadena ligera. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada y al menos una porción de una región constante de cadena pesada, y dos cadenas ligeras, en donde cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera y al menos una porción de una región constante de cadena ligera. Como se usa en el presente documento, se considera que un Fv monocatenario (scFv), o cualquier otro anticuerpo que comprenda, por ejemplo, una sola cadena polipeptídica que comprende las seis CDR (tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera) tiene una cadena pesada y una cadena ligera. En algunas de dichas realizaciones, la cadena pesada es la región del anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada y la cadena ligera es la región del anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena ligera.

La expresión "**región variable de cadena pesada**", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende la CDR1, región marco (FR) 2, CDR2, FR3 y CDR3 de cadena pesada. En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada también comprende al menos una parte de una FR1 y/o al menos una parte de una FR4. En algunas realizaciones, una CDR1 de cadena pesada corresponde a los residuos 26 a 35 de Kabat; una CDR2 de cadena pesada corresponde a los residuos 50 a 65 de Kabat; y una CDR3 de cadena pesada corresponde a los residuos 95 a 102 de Kabat. Véase, por ejemplo, Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, Md.); y la Figura 1. En algunas realizaciones, una CDR1 de cadena pesada corresponde a los residuos 31 a 35 de Kabat; una CDR2 de cadena pesada corresponde a los residuos 50 a 65 de Kabat; y una CDR3 de cadena pesada corresponde a los residuos 95 a 102 de Kabat. véase *la id.*

La expresión "**región constante de cadena pesada**", como se usa en el presente documento, se refiere a una región que comprende al menos tres dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Las regiones constantes de cadena pesada a modo de ejemplo no limitantes, incluyen γ , δ y α . Las regiones constantes de cadena pesada a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen ϵ y μ . Cada región constante pesada corresponde a un isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región constante γ es un anticuerpo IgG, un anticuerpo que comprende una región constante δ es un anticuerpo IgD, y un anticuerpo que comprende una región constante α es un anticuerpo IgA. Además, un anticuerpo que comprende una región constante μ es un anticuerpo IgM, y un anticuerpo que comprende una región constante ϵ es un anticuerpo IgE. Ciertos isotipos pueden subdividirse adicionalmente en subclases. Por ejemplo, los anticuerpos IgG incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos IgG1 (que comprende una región constante γ_1), IgG2 (que comprende una región constante γ_2), IgG3 (que comprende una región constante γ_3) e IgG4 (que comprende una región constante γ_4); los anticuerpos IgA incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos IgA1 (que comprende una región constante α_1) e IgA2 (que comprende una región constante α_2); los anticuerpos IgG incluyen, pero sin limitación, IgM1 e IgM2.

En algunas realizaciones, una región constante de cadena pesada comprende una o más mutaciones (o sustituciones), adiciones o deleciones que confieren una característica deseada al anticuerpo. Una mutación a modo de ejemplo no limitante, es la mutación S241P en la región bisagra de IgG4 (entre los dominios constantes C_H1 y C_H2), que altera el motivo CPSCP de IgG4 a CPPCP, que es similar al motivo correspondiente en IgG1. Esta mutación, en algunas realizaciones, da como resultado un anticuerpo IgG4 más estable. Véase, por ejemplo, Angal et al., *Mol. Immunol.* 30: 105-108 (1993); Bloom et al., *Prot. Sci.* 6: 407-415 (1997); Schuurman et al., *Mol. Immunol.* 38: 1-8 (2001).

La expresión "**cadena pesada**" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena pesada, con o sin una secuencia líder. En algunas realizaciones, una cadena pesada comprende al menos una porción de una región constante de cadena pesada. La expresión "**cadena pesada de longitud completa**" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, con o sin una secuencia líder.

La expresión "**región variable de cadena ligera**" como se usa en el presente documento se refiere a una región que comprende la CDR1 de cadena ligera, región marco (FR) 2, CDR2, FR3 y CDR3. En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera también comprende una FR1 y/o una FR4. En algunas realizaciones, una CDR1 de cadena ligera corresponde a los residuos 24 a 34 de Kabat; una CDR2 de cadena ligera corresponde a los residuos 50 a 56 de Kabat; y una CDR3 de cadena ligera corresponde a los residuos 89 a 97 de Kabat. Véase, por ejemplo, Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 and 1991, NIH, Bethesda, Md.); y la Figura 1.

La expresión "**región constante de cadena ligera**" como se usa en el presente documento se refiere a una región que comprende un dominio constante de cadena ligera, C_L. Las regiones constantes de cadena ligera a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen λ y κ .

La expresión "**cadena ligera**" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena ligera, con o sin una secuencia líder. En algunas realizaciones, una cadena ligera comprende al menos una porción de una región constante de cadena ligera. La expresión "**cadena ligera de longitud completa**" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera, con o sin una secuencia líder.

Un "**anticuerpo quimérico**" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una región variable de una primera especie (tales como ratón, rata, mono cynomolgus, etc.) y al menos una región constante de una segunda especie (tal como ser humano, mono cynomolgus, etc.). En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de ratón y al menos una región constante humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de cynomolgus y al menos una región constante humana. En algunas realizaciones, todas las regiones variables de un anticuerpo quimérico son de una primera especie y todas las regiones constantes del anticuerpo quimérico son de una segunda especie.

Un "**anticuerpo humanizado**" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo en el que al menos un aminoácido en una región marco de una región variable no humana se ha reemplazado con el aminoácido correspondiente de una región variable humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende al menos una región constante humana o fragmento de la misma. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado

es un Fab, un scFv, un (Fab')₂, etc.

Un "**anticuerpo injertado con CDR**", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo humanizado en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una primera especie (no humana) se han injertado en las regiones marco (FR) de una segunda especie (humana).

Un "**anticuerpo humano**", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos producidos en seres humanos, anticuerpos producidos en animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulinas humanas, como XenoMouse®, y anticuerpos seleccionados utilizando métodos *in vitro*, como la presentación en fagos, en donde el repertorio de anticuerpos se basa en unas secuencias de inmunoglobulinas humanas.

La expresión "**secuencia líder**" se refiere a una secuencia de restos de aminoácidos ubicados en el extremo N de un polipéptido que facilita la secreción de un polipéptido de una célula de mamífero. Una secuencia líder puede ser escindida tras la exportación del polipéptido de la célula de mamífero, formando una proteína madura. Las secuencias líder pueden ser naturales o sintéticas, y pueden ser heterólogas u homólogas a la proteína a la que están unidas. Las secuencias líderes a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, secuencias líderes de anticuerpos, tal como, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 y 4, que corresponden a secuencias líder de cadenas ligeras y pesadas humanas, respectivamente. Las secuencias líder a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen secuencias líder de proteínas heterólogas. En algunas realizaciones, un anticuerpo carece de una secuencia líder. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende al menos una secuencia líder, que puede seleccionarse de secuencias líderes de anticuerpos nativos y secuencias líderes heterólogas.

El término "**vector**" se utiliza para describir un polinucleótido que puede modificarse por ingeniería genética para contener un polinucleótido o polinucleótidos clonados que pueden propagarse en una célula hospedadora. Un vector puede incluir uno o más de los siguientes elementos: un origen de replicación, una o más secuencias reguladoras (tales como, por ejemplo, promotores y/o potenciadores) que regulan la expresión del polipéptido de interés y/o uno o más genes marcadores seleccionables (tales como, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos y genes que pueden usarse en ensayos colorimétricos, por ejemplo, β-galactosidasa). La expresión "**vector de expresión**" se refiere a un vector que se usa para expresar un polipéptido de interés en una célula hospedadora.

Una "**célula hospedadora**" se refiere a una célula que puede ser o ha sido un receptor de un vector o polinucleótido aislado. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas o células eucariotas. Las células eucariotas a modo de ejemplo incluyen células de mamífero, tales como células animales primates o no primates; células fúngicas, tales como levadura; células vegetales; y células de insecto. Las células de mamífero a modo de ejemplo no limitantes, incluyen, pero sin limitación, células NSO, células PER.C6® (Crucell) y células 293 y CHO, y sus derivadas, tales como células 293-6E y DG44, respectivamente.

El término "**aislado**" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido se denomina "aislado" cuando se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo. Cuando un polipéptido es secretado por una célula después de la expresión, se considera que la separación física del sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que lo produjo es el "aislamiento" del polipéptido. De manera similar, un polinucleótido se denomina "aislado" cuando no forma parte del polinucleótido más grande (tal como, por ejemplo, del ADN genómico o del ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) en el que se encuentra normalmente en la naturaleza, o separado de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo, por ejemplo, en el caso de un polinucleótido de ARN. Por lo tanto, un polinucleótido de ADN que está contenido en un vector dentro de una célula hospedadora puede denominarse "aislado" siempre que ese polinucleótido no se encuentre en ese vector en la naturaleza.

Los términos "**sujeto**" y "**paciente**" se usan indistintamente para referirse a un ser humano. En algunas realizaciones, también se proporcionan métodos para tratar otros mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, roedores, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales de laboratorio mamíferos, animales de granja mamíferos, animales de deporte mamíferos y mascotas mamíferos.

La expresión "**artritis reumatoide**" ("**RA**") se refiere a una enfermedad autoinmunitaria crónica caracterizada principalmente por la inflamación del revestimiento (sinovial) de las articulaciones, que puede provocar daño articular, lo que produce dolor crónico, pérdida de la función y discapacidad. Debido a que la RA puede afectar a múltiples órganos del cuerpo, incluidos la piel, los pulmones y los ojos, se la denomina enfermedad sistémica.

La expresión "**esclerosis múltiple**" ("**MS**") se refiere a la enfermedad desmielinizante, autoinmunitaria y crónica del SNC, en la cual el cuerpo genera anticuerpos y glóbulos blancos contra las células que producen la vaina de mielina. La "**desmielinización**" ocurre cuando la vaina de mielina se inflama, se lesiona y se separa de la fibra nerviosa.

El término "**cáncer**" se refiere a un trastorno proliferativo asociado con la proliferación celular incontrolada, el crecimiento celular no restringido y la disminución de la muerte celular. El cáncer incluye, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de tiroides, cáncer de esófago, melanoma,

linfomas foliculares, melanoma maligno uveal, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, adenocarcinoma pulmonar, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de colon, tumores cardíacos, cáncer pancreático, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de intestino, cáncer de testículos, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de ovarios, leucemia (incluidas leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, 5 incluídas mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), síndrome mielodisplásico policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedades de la cadena pesada y tumores sólidos que incluyen, pero sin limitación, sarcomas y carcinomas como el fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, 10 angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, 15 cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma y menangioma. Las expresiones "**metástasis**" y "**metástasis del cáncer**" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a la capacidad de una célula cancerosa para propagarse a otros tejidos. Por ejemplo, "**metástasis en hueso**" se refiere a la capacidad de ciertos tipos de cáncer que incluyen, 20 pero sin limitación, mama, próstata, pulmón, riñón, tiroides y melanoma, de hacer metástasis en hueso.

La expresión "**trastornos osteolíticos**" se usa en el presente documento para referirse a cualquier afección causada por un aumento en la actividad de los osteoclastos, que son células responsables de la resorción ósea. Las expresiones "**osteólisis**" y "**pérdida osteolítica de hueso**" se pueden usar indistintamente para referirse a la 25 resorción ósea mediada por osteoclastos o pérdida ósea asociada con un trastorno osteolítico. Los trastornos osteolíticos pueden ocurrir en sujetos con una predisposición a desarrollar un trastorno osteolítico, o pueden ocurrir en sujetos con una enfermedad que conduce o contribuye a un trastorno osteolítico al estimular la actividad de los osteoclastos. En realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, el trastorno osteolítico puede incluir la pérdida osteolítica de hueso y la pérdida osteolítica de hueso inducida por metástasis del cáncer. En otras realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, el trastorno óseo osteolítico incluye enfermedad metabólica 30 ósea, incluyendo endocrinopatías, tales como el hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, e hipertiroidismo; deficiencia dietética, incluyendo raquitismo, osteomalacia, escorbuto, y desnutrición; osteoporosis; el consumo de drogas, incluidos los glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina y alcohol; enfermedad crónica, incluyendo síndromes de malabsorción; insuficiencia renal crónica, incluyendo osteodistrofia renal; enfermedad crónica del hígado, incluyendo osteodistrofia hepática; enfermedad hereditaria, incluyendo osteogénesis imperfecta y homocistinuria; e inflamación ósea asociada a artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, displasia fibrosa, enfermedad periodontal y enfermedad de Paget.

Las expresiones "**pérdida ósea osteolítica inducida por metástasis**" y "**pérdida ósea osteolítica inducida por metástasis de cáncer**", se usan indistintamente en el presente documento para referirse a osteólisis o pérdida ósea osteolítica resultante de metástasis de células cancerosas en hueso. La expresión "**activación de osteoclastos inducida por metástasis de cáncer**" se usa en el presente documento para referirse a la capacidad de las células cancerosas que se han metastatizado en hueso para inducir la activación de los osteoclastos. 40

El término "**tumor**" se usa en el presente documento para referirse a un grupo de células que muestran niveles anormalmente altos de proliferación y crecimiento. Un tumor puede ser benigno, premaligno o maligno; las células tumorales malignas son cancerosas. Las células tumorales pueden ser células tumorales sólidas o células tumorales leucémicas. La expresión "**crecimiento tumoral**" se usa en el presente documento para referirse a la proliferación o crecimiento de una célula o células que comprenden un tumor que conduce a un aumento correspondiente en el tamaño del tumor. La expresión "**crecimiento tumoral dependiente de CSF1R**" se usa en el presente documento para referirse al requisito de una célula o células tumorales para la función o funciones mediadas por CSF1R para que la célula o células tumorales proliferen o crezcan. 50

"**Tratamiento**", como se usa en el presente documento, abarca cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para la enfermedad en un mamífero, incluido un ser humano, e incluye inhibir la enfermedad o la progresión de la enfermedad, inhibir o retardar la enfermedad o su progresión, detener su desarrollo, aliviar parcial o totalmente la enfermedad, o curar la enfermedad, por ejemplo, causando regresión, o restaurando o reparando una función perdida, ausente o defectuosa; o estimular un proceso ineficiente. 55

Los términos "**inhibición**" o "**inhibir**" se refieren a una disminución o cese de cualquier característica fenotípica o a la disminución o cese en la incidencia, el grado o la probabilidad de esa característica. 60

Un "**vehículo farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un relleno no tóxico sólido, semisólido o líquido, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de formulación o vehículo convencional en la técnica para su uso con un agente terapéutico que juntos comprenden una "**composición farmacéutica**" para administración a un sujeto. Un vehículo 65

farmacéuticamente aceptable es no tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El vehículo farmacéuticamente aceptable es apropiado para la formulación empleada. Por ejemplo, si el agente terapéutico se administra por vía oral, el vehículo puede ser una cápsula de gel. Si el agente terapéutico se administra por vía subcutánea, lo ideal es que el vehículo no sea irritable para la piel y no cause reacción en el lugar de la inyección.

Anticuerpos anti-CSF1R

Los presentes inventores han inventado un nuevo conjunto de anticuerpos dirigidos contra CSF1R. Los anticuerpos anti-CSF1R incluyen, pero sin limitación, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, y anticuerpos que comprenden las CDR de cadena pesada y/o cadena ligera analizados en el presente documento.

Anticuerpos humanizados a modo de ejemplo

En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos humanizados que se unen a CSF1R. Los anticuerpos humanizados son útiles como moléculas terapéuticas porque los anticuerpos humanizados reducen o eliminan la respuesta inmunitaria humana frente a anticuerpos no humanos (tal como la respuesta de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA)), que puede dar como resultado una respuesta inmunitaria a un anticuerpo terapéutico, y una eficacia disminuida del agente terapéutico.

Los anticuerpos humanizados a modo de ejemplo no limitantes, incluyen de Ab1 a Ab16, descritos en el presente documento. Los anticuerpos humanizados a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado de Ab1 a Ab16 y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de Ab1 a Ab16. Los anticuerpos humanizados a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada seleccionada entre las SEQ ID NO: 39 a 45 y/o una región variable de cadena ligera seleccionada entre las SEQ ID NO: 46 a 52. Los anticuerpos humanizados a modo de ejemplo también incluyen, pero sin limitación, anticuerpos humanizados que comprenden la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y/o la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 0301,0302 y 0311.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humanizado comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 0301, 0302 y 0311. Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada seleccionados de: las SEQ ID NO: 15, 16 y 17; las SEQ ID NO: 21, 22 y 23; y las SEQ ID NO: 27, 28 y 29. Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera seleccionados de: las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; las SEQ ID NO: 24, 25 y 26; y las SEQ ID NO: 30, 31 y 32.

Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden los conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de la Tabla 1 (SEQ ID NO mostradas; véase la Tabla 8 par alas secuencias). Cada fila de la Tabla 1 muestra la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo a modo de ejemplo.

Tabla 1: CDR de cadena pesada y de cadena ligera

Cadena pesada			Cadena ligera		
SEQ ID de CDR1	SEQ ID de CDR2	SEQ ID de CDR3	SEQ ID de CDR1	SEQ ID de CDR2	SEQ ID de CDR3
15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32

Anticuerpos humanizados a modo de ejemplo Adicionales

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humanizado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13, y 39 a 45 y en donde el anticuerpo se une a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humanizado comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52, en donde el anticuerpo se une a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humanizado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45; y una cadena ligera que comprende una secuencia

de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52; en donde el anticuerpo se une a CSF1R.

5 Como se usa en el presente documento, si un polipéptido particular es, por ejemplo, al menos el 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos puede determinarse utilizando, por ejemplo, un programa informático. Cuando se determina si una secuencia particular es, por ejemplo, el 95 % idéntica a una secuencia de referencia, el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia.

10 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humanizado comprende al menos una de las CDR analizadas en el presente documento. Es decir, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humanizado comprende al menos una CDR seleccionada de una CDR1 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR3 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR1 de cadena ligera analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena ligera analizada en el presente documento y una CDR3 de cadena ligera analizada en el presente documento. Además, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humanizado comprende al menos una CDR mutada basada en una CDR analizada en el presente documento, en donde la CDR mutada comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en relación con la CDR analizada en el presente documento. En algunas realizaciones, una o más de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas. Un experto en la materia puede seleccionar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas para una secuencia de CDR particular, en donde no se prevé que las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas alteren significativamente las propiedades de unión del anticuerpo que comprende la CDR mutada.

25 Los ejemplos de anticuerpos anti-CSF1R humanizados también incluyen anticuerpos que compiten por la unión a CSF1R con un anticuerpo descrito en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CSF1R humanizado que compite por la unión a CSF1R con un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311; y versiones de anticuerpos bivalentes (es decir, que tienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) de esas Fab.

30 *Regiones constantes de anticuerpos humanizados a modo de ejemplo*

En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado descrito en el presente documento comprende una o más regiones constantes humanas. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG e IgD. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ . En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado descrito en el presente documento comprende una mutación S241P en la región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

45 La elección de la región constante de la cadena pesada puede determinar si un anticuerpo tendrá o no función efectora *in vivo*. Dicha función efectora, en algunas realizaciones, incluye citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y puede dar como resultado la muerte de la célula a la que se une el anticuerpo. En algunos métodos de tratamiento, incluidos los métodos para tratar algunos cánceres, la muerte celular puede ser deseable, por ejemplo, cuando el anticuerpo se une a una célula que apoya el mantenimiento o crecimiento del tumor. Las células a modo de ejemplo que pueden apoyar el mantenimiento o crecimiento de un tumor incluyen, pero sin limitación, células tumorales en sí mismas, células que ayudan en el reclutamiento de la vasculatura en el tumor y células que proporcionan ligandos, factores de crecimiento o contra-receptores que apoyan o promueven el crecimiento del tumor o la supervivencia del tumor. En algunas realizaciones, cuando es deseable la función efectora, se selecciona un anticuerpo anti-CSF1R que comprende una cadena pesada de IgG1 humana o una cadena pesada de IgG3 humana.

55 En algunos métodos de tratamiento, la función efectora puede no ser deseable. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede ser deseable que los anticuerpos utilizados en el tratamiento de la MS y/o la RA y/u osteólisis no tengan una función efectora. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CSF1R desarrollados para el tratamiento del cáncer pueden no ser adecuados para su uso en el tratamiento de la MS y/o la RA y/u osteólisis. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo anti-CSF1R que carece de una función efectora significativa en el tratamiento de la MS y/o la RA y/u osteólisis. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R para el tratamiento de MS y/o RA y/u osteólisis comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humana. En algunas realizaciones, una región constante de IgG4 comprende una mutación S241P.

65 Un anticuerpo puede humanizarse por cualquier método. Los métodos a modo de ejemplo de humanización sin limitación, incluyen los métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370; Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-27 (1988); Verhoeven et al., *Science* 239: 1534-36 (1988); y la publicación de Estados Unidos n.º US 2009/0136500.

5 Como se ha señalado anteriormente, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo en el que al menos un aminoácido en una región marco de una región variable no humana se ha reemplazado con el aminoácido de la ubicación correspondiente en una región marco humana. En algunas realizaciones, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos en las regiones marco de una región variable no humana se reemplazan con un aminoácido de una o más ubicaciones correspondientes en una o más regiones marco humanas.

10 En algunas realizaciones, algunos de los aminoácidos humanos correspondientes utilizados para la sustitución provienen de las regiones marco de diferentes genes de inmunoglobulinas humanas. Es decir, en algunas de dichas realizaciones, uno o más de los aminoácidos no humanos pueden reemplazarse con los aminoácidos correspondientes de una región marco humana de un primer anticuerpo humano o codificarse por un primer gen de inmunoglobulina humana, uno o más de los aminoácidos no humanos pueden reemplazarse con los aminoácidos correspondientes de una región marco humana de un segundo anticuerpo humano o codificarse por un segundo gen de inmunoglobulina humana, uno o más de los aminoácidos no humanos pueden reemplazarse con los aminoácidos correspondientes de una región marco humana de un tercer anticuerpo humano o codificarse por un tercer gen de inmunoglobulina humana, etc. Además, en algunas realizaciones, no es necesario que todos los aminoácidos humanos correspondientes que se utilizan para la sustitución en una sola región marco, por ejemplo, FR2, sean de la misma región marco humana. En algunas realizaciones, sin embargo, todos los aminoácidos humanos correspondientes que se utilizan para la sustitución proceden del mismo anticuerpo humano o están codificados por el mismo gen de inmunoglobulina humana.

25 En algunas realizaciones, un anticuerpo se humaniza reemplazando una o más regiones marco completas con las regiones marco humanas correspondientes. En algunas realizaciones, se selecciona una región marco humana que tiene el mayor nivel de homología con la región marco no humana que se reemplaza. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado de este tipo es un anticuerpo injertado con CDR.

30 En algunas realizaciones, después del injerto con CDR, uno o más aminoácidos de la región marco se cambian de nuevo al aminoácido correspondiente en la región marco de ratón. Dichas "reversiones" se realizan, en algunas realizaciones, para retener uno o más aminoácidos de región marco de ratón que parecen contribuir a la estructura de una o más de las CDR y/o que pueden estar involucrados en los contactos con antígenos y/o parecen estar involucrados en la integridad estructural general del anticuerpo. En algunas realizaciones se realizan, diez o menos, nueve o menos, ocho o menos, siete o menos, seis o menos, cinco o menos, cuatro o menos, tres o menos, dos o menos, una o cero reversiones en las regiones marco de un anticuerpo después del injerto con CDR.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado también comprende una región constante de cadena pesada humana y/o una región constante de cadena ligera humana.

Anticuerpos Quiméricos a modo de ejemplo

40 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una región variable no humana y al menos una región constante humana. En algunas de dichas realizaciones, todas las regiones variables de un anticuerpo anti-CSF1R son regiones variables no humanas y todas las regiones constantes de un anticuerpo anti-CSF1R son regiones constantes humanas. En algunas realizaciones, una o más regiones variables de un anticuerpo quimérico son regiones variables de ratón. La región constante humana de un anticuerpo quimérico no necesita ser del mismo isotipo que la región constante no humana, si la hubiera, que reemplaza. Se analizan anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y en Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-55 (1984).

50 Los anticuerpos quiméricos a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo seleccionado de 0301, 0302 y 0311. Los anticuerpos quiméricos a modo de ejemplo no limitantes, adicionales incluyen anticuerpos quiméricos que comprenden la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y/o la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de 0301, 0302 y 0311.

55 Los anticuerpos anti-CSF1R quiméricos a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden los siguientes pares de regiones variables de cadena pesada y ligera: las SEQ ID NO: 9 y 10; las SEQ ID NO: 11 y 12; y las SEQ ID NO: 13 y 14.

60 Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden un conjunto de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera mostrados anteriormente en la Tabla 1.

Anticuerpos quiméricos a modo de ejemplo Adicionales

65 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R quimérico comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al

menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45, en donde el anticuerpo se une a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R quimérico comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52, en donde el anticuerpo se une a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R quimérico comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45; y una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52; en donde el anticuerpo se une a CSF1R.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R quimérico comprende al menos una de las CDR analizadas en el presente documento. Es decir, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R quimérico comprende al menos una CDR seleccionada de una CDR1 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR3 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR1 de cadena ligera analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena ligera analizada en el presente documento y una CDR3 de cadena ligera analizada en el presente documento. Además, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R quimérico comprende al menos una CDR mutada basada en una CDR analizada en el presente documento, en donde la CDR mutada comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en relación con la CDR analizada en el presente documento. En algunas realizaciones, una o más de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas. Un experto en la materia puede seleccionar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas para una secuencia de CDR particular, en donde no se prevé que las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas alteren significativamente las propiedades de unión del anticuerpo que comprende la CDR mutada.

Los anticuerpos anti-CSF1R quiméricos a modo de ejemplo también incluyen anticuerpos quiméricos que compiten por la unión a CSF1R con un anticuerpo descrito en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CSF1R quimérico que compite por la unión a CSF1R con un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311; y versiones de anticuerpos bivalentes (es decir, que tienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) de esas Fab.

35 *Regiones constantes de anticuerpos quiméricos a modo de ejemplo*

En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una o más regiones constantes humanas. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG e IgD. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ . En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunas de dichas realizaciones, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una mutación S241P en la región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

Como se ha señalado anteriormente, si la función efectora es o no deseable puede depender del método particular de tratamiento destinado a un anticuerpo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, cuando es deseable la función efectora, se selecciona un anticuerpo anti-CSF1R quimérico que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana. En algunas realizaciones, cuando no es deseable la función efectora, se selecciona un anticuerpo quimérico anti-CSF1R que comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humanas.

55 Anticuerpos Humanos a modo de ejemplo

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Los métodos a modo de ejemplo no limitantes, incluyen la producción de anticuerpos humanos en ratones transgénicos que comprenden loci de inmunoglobulinas humanas. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-55 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-8 (1993); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-9 (1994); y las patentes de Estados Unidos con números 5.545.807; 6.713.610; 6.673.986; 6.162.963; 5.545.807; 6.300.129; 6.255.458; 5.877.397; 5.874.299; y 5.545.806.

Los métodos a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen la producción de anticuerpos humanos utilizando bibliotecas de presentación en fagos. Véase, por ejemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227: 381-8 (1992); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-97 (1991); y la publicación PCT N.º WO 99/10494.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humano se une a un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Los anticuerpos anti-CSF1R humanos a modo de ejemplo también incluyen anticuerpos que compiten por la unión a CSF1R con un anticuerpo descrito en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CSF1R humano que compite por la unión a CSF1R con un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311, y versiones de anticuerpos bivalentes (es decir, que tienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) de esas Fab.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R humano comprende una o más regiones constantes humanas. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG e IgD. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ . En algunas realizaciones, un anticuerpo humano descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano descrito en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunas de dichas realizaciones, un anticuerpo humano descrito en el presente documento comprende una mutación S241P en la región constante de IgG4 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

En algunas realizaciones, cuando es deseable la función efectora, se selecciona un anticuerpo anti-CSF1R humano que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana. En algunas realizaciones, cuando no es deseable la función efectora, se selecciona un anticuerpo anti-CSF1R humano que comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humanas.

Anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo Adicionales

Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo también incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de ratón, humanizados, humanos, quiméricos y genéticamente modificados que comprenden, por ejemplo, una o más de las secuencias de CDR descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende una región variable de cadena pesada descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende una región variable de cadena ligera descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CSF1R comprende una región variable de cadena pesada descrita en el presente documento y una región variable de cadena ligera descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada descritas en el presente documento y la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado de los anticuerpos humanizados Ab1 a Ab16. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende una región variable de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 311. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de los anticuerpos humanizados Ab1 a Ab16. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de los anticuerpos humanizados Ab1 a Ab16. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden los siguientes pares de regiones variables de cadena pesada y ligera: las SEQ ID NO: 9 y 10; las SEQ ID NO: 11 y 12; y las SEQ ID NO: 13 y 14; las SEQ ID NO: 39 y 40; las SEQ ID NO: 41 y 42; las SEQ ID NO: 43 y 44; las SEQ ID NO: 45 y 46; las SEQ ID NO: 47 y 48; las SEQ ID NO: 49 y 50; y las SEQ ID NO: 51 y 52. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, también incluyen anticuerpos que comprenden los siguientes pares de cadenas pesadas y ligeras: las SEQ ID NO: 33 y 34; las SEQ ID NO: 35 y 36; y las SEQ ID NO: 37 y 38.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada seleccionadas de: las SEQ ID NO: 15, 16 y 17; las SEQ ID NO: 21, 22 y 23; y las SEQ ID NO: 27, 28 y 29.

5 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311. Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo no limitantes, incluyen anticuerpos que comprenden conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera seleccionadas de: las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; las SEQ ID NO: 24, 25 y 26; y las SEQ ID NO: 30, 31 y 32.

10 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y la CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311.

Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo sin limitación, incluyen anticuerpos que comprenden los conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera mostrados anteriormente en la Tabla 1.

Anticuerpos a modo de ejemplo Adicionales

15 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45, en donde el anticuerpo se une a CSF1R. En algunas realizaciones,

20 un anticuerpo anti-CSF1R comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52, en donde el anticuerpo se une a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-

25 CSF1R comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45; y una cadena ligera que comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52;

30 en donde el anticuerpo se une a CSF1R.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una de las CDR analizadas en el presente documento. Es decir, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una CDR seleccionada

35 de una CDR1 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR3 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR1 de cadena ligera analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena ligera analizada en el presente documento y una CDR3 de cadena ligera analizada en el presente documento. Además, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una CDR mutada basada en una CDR analizada en el presente documento, en donde la CDR mutada comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en relación con la CDR analizada en el presente

40 documento. En algunas realizaciones, una o más de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas. Un experto en la materia puede seleccionar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas para una secuencia de CDR particular, en donde no se prevé que las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas alteren significativamente las propiedades de unión del anticuerpo que comprende la CDR mutada.

45 Los anticuerpos anti-CSF1R a modo de ejemplo también incluyen anticuerpos que compiten por la unión a CSF1R con un anticuerpo descrito en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-CSF1R que compite por la unión a CSF1R con un anticuerpo seleccionado de Fab 0301, 0302 y 0311 y versiones de anticuerpos bivalentes (es decir, que tienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) de esos Fab.

Regiones constantes de anticuerpos a modo de ejemplo

En algunas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una o más regiones constantes humanas. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado

55 de IgA, IgG e IgD. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena ligera humana es de un isotipo seleccionado de κ y λ . En algunas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunas de dichas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una mutación S241P en la región constante de IgG4

60 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de IgG4 humana y una cadena ligera κ humana.

Como se ha señalado anteriormente, si la función efectora es o no deseable puede depender del método particular de

65 tratamiento destinado a un anticuerpo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, cuando es deseable la función efectora, se selecciona un anticuerpo anti-CSF1R que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana o una región constante de cadena pesada de IgG3 humana. En algunas realizaciones, cuando no es deseable la función

ES 2 706 412 T3

efectora, se selecciona un anticuerpo anti-CSF1R que comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humanas.

Regiones Variables de Cadena Pesada de Anti-CSF1R a modo de ejemplo

- 5 En algunas realizaciones, se proporcionan regiones variables de cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R. En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R es una región variable de ratón, una región variable humana o una región variable humanizada.
- 10 Una región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR1, FR2, CDR2, FR3 y CDR3 de cadena pesada. En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende además una FR1 y/o FR4 de cadena pesada. Las regiones variables de cadena pesada a modo de ejemplo no limitantes, incluyen, pero sin limitación, regiones variables de cadena pesada que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45.
- 15 En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR1 que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 15, 21 y 27.
- 20 En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR2 que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 16, 22 y 28.
- En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR3 que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 17, 23 y 29.
- 25 Las regiones variables de cadena pesada a modo de ejemplo no limitantes, incluyen, pero sin limitación, regiones variables de cadena pesada que comprenden conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas entre: las SEQ ID NO: 15, 16 y 17; las SEQ ID NO: 21, 22 y 23; y las SEQ ID NO: 27, 28 y 29.
- 30 En algunas realizaciones, una cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 9, 11, 13 y 39 a 45, en donde la cadena pesada, junto con una cadena ligera, es capaz de formar un anticuerpo que se une a CSF1R.
- 35 En algunas realizaciones, una cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una de las CDR analizadas en el presente documento. Es decir, en algunas realizaciones, una cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una CDR seleccionada de una CDR1 de cadena pesada analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena pesada analizada en el presente documento y una CDR3 de cadena pesada analizada en el presente documento. Además, en algunas realizaciones, una cadena pesada de anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una CDR mutada basada en una CDR analizada en el presente documento, en donde la CDR mutada comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en relación con la CDR analizada en el presente documento. En algunas realizaciones, una o más de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas. Un experto en la materia puede seleccionar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas para una secuencia de CDR particular, en donde no se prevé que las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas alteren significativamente las propiedades de unión de la cadena pesada que comprende la CDR mutada.
- 40
- 45
- 50 En algunas realizaciones, una cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada. En algunas realizaciones, una cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada humana es de un isotipo seleccionado de IgA, IgG e IgD. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada humana es una región constante de IgG. En algunas realizaciones, una cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunas de dichas realizaciones, la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende una mutación S241P.
- 55 En algunas realizaciones, cuando es deseable la función efectora, una cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG3 humanas. En algunas realizaciones, cuando la función efectora es menos deseable, una cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 o IgG2 humanas.

Regiones Variables de Cadena Ligera de Anti-CSF1R a modo de ejemplo

- 60 En algunas realizaciones, se proporcionan regiones variables de cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R. En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R es una región variable de ratón, una región variable humana o una región variable humanizada.
- 65 Una región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR1, FR2, CDR2, FR3 y CDR3 de cadena ligera. En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende

además una FR1 y/o FR4 de cadena ligera. Las regiones variables de cadena ligera a modo de ejemplo no limitantes, incluyen regiones variables de cadena ligera que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52.

5 En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR1 que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 18, 24 y 30.

En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR2 que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 19, 25 y 31.

10 En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende una CDR3 que comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 20, 26 y 32.

15 Las regiones variables de cadena ligera a modo de ejemplo no limitantes, incluyen, pero sin limitación, regiones variables de cadena ligera que comprenden conjuntos de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas entre: las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; las SEQ ID NO: 24, 25 y 26; y las SEQ ID NO: 30, 31 y 32.

20 En algunas realizaciones, una cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende una secuencia de región variable que es al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 10, 12, 14 y 46 a 52, en donde la cadena ligera, junto con una cadena pesada, es capaz de formar un anticuerpo que se une a CSF1R.

25 En algunas realizaciones, una cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una de las CDR analizadas en el presente documento. Es decir, en algunas realizaciones, una cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una CDR seleccionada de una CDR1 de cadena ligera analizada en el presente documento, una CDR2 de cadena ligera analizada en el presente documento y una CDR3 de cadena ligera analizada en el presente documento. Además, en algunas realizaciones, una cadena ligera de anticuerpo anti-CSF1R comprende al menos una CDR mutada basada en una CDR analizada en el presente documento, en donde la CDR mutada comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos en relación con la CDR analizada en el presente documento. En algunas realizaciones, una o más de las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas. Un experto en la materia puede seleccionar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas para una secuencia de CDR particular, en donde no se prevé que las sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas alteren significativamente las propiedades de unión de la cadena ligera que comprende la CDR mutada.

35 En algunas realizaciones, una cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana. En algunas realizaciones, una región constante de la cadena ligera humana se selecciona de entre una región constante de la cadena ligera κ humana y λ humana.

40 Moléculas de unión a CSF1R Adicionales a modo de ejemplo

En algunas realizaciones, se proporcionan moléculas adicionales que se unen a CSF1R. Dichas moléculas incluyen, pero sin limitación, armazones no canónicos, tales como anticualinas, adnectinas, repeticiones de anquirina, etc. Véase, por ejemplo, Hosse et al., *Prot. Sci.* 15:14 (2006); Fiedler, M. y Skerra, A., "Non-Antibody Scaffolds," págs.467-499 en *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Dubel, S., ed., Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2007.

45 Propiedades a modo de ejemplo de anticuerpos anti-CSF1R

50 En algunas realizaciones, un anticuerpo que tiene una estructura descrita anteriormente se une a CSF1R con una afinidad de unión (K_D) de menos de 1 nM, bloquea la unión de CSF1 y/o IL34 a CSF1R e inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por CSF1 y/o IL34.

55 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R se une al dominio extracelular de CSF1R (CSF1R-ECD). En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R tiene una afinidad de unión (K_D) por CSF1R de menos de 1 nM, menos de 0,5 nM, menos de 0,1 nM o menos de 0,05 nM. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R tiene una K_D de entre 0,01 y 1 nM, entre 0,01 y 0,5 nM, entre 0,01 y 0,1 nM, entre 0,01 nM y 0,05 nM, o entre 0,02 nM y 0,05 nM.

60 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R bloquea la unión del ligando a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R bloquea la unión de CSF1 a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R bloquea la unión de IL34 a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R bloquea la unión tanto de CSF1 como de IL34 a CSF1R. En algunas realizaciones, un anticuerpo que bloquea la unión del ligando se une al dominio extracelular de CSF1R. Se considera que un anticuerpo "bloquea la unión del ligando a CSF1R" cuando reduce la cantidad de unión detectable de un ligando a CSF1R en al menos un 50 %, usando el ensayo descrito en el Ejemplo 7. En algunas realizaciones, un anticuerpo reduce la cantidad de unión detectable de un ligando a CSF1R en al menos un 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 %, usando el ensayo descrito en el Ejemplo 7. En algunas de dichas realizaciones, se dice que el anticuerpo bloquea la unión del ligando en al menos el 50 %, al

menos el 60 %, al menos el 70 %, etc.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por ligando. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por CSF1. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por IL34. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R inhibe la fosforilación de CSF1R tanto inducida por CSF1 como inducida por IL34. Se considera que un anticuerpo "inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por ligando" cuando reduce la cantidad de fosforilación de CSF1R inducida por ligando detectable en al menos el 50 %, usando el ensayo descrito en el Ejemplo 6. En algunas realizaciones, un anticuerpo reduce la cantidad de fosforilación de CSF1R inducida por ligando detectable en al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 %, usando el ensayo descrito en el Ejemplo 6. En algunas de dichas realizaciones, se dice que el anticuerpo inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por ligando en al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, etc.

En algunas realizaciones, un anticuerpo inhibe las respuestas de proliferación y/o supervivencia de monocitos en presencia de CSF1 y/o IL34. Se considera que un anticuerpo "inhibe las respuestas de proliferación y/o supervivencia de monocitos" cuando reduce la cantidad de respuestas de proliferación y/o supervivencia de monocitos en presencia de CSF1 y/o IL34 en al menos el 50 %, usando el ensayo descrito en el Ejemplo 10. En algunas realizaciones, un anticuerpo reduce la cantidad de respuestas de proliferación y/o supervivencia de monocitos en presencia de CSF1 y/o IL34 en al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 %, usando el ensayo descrito en el Ejemplo 10. En algunas de dichas realizaciones, se dice que el anticuerpo inhibe las respuestas de proliferación y/o supervivencia de monocitos en al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, etc.

Anticuerpos Conjugados a modo de ejemplo

En algunas realizaciones, se conjuga un anticuerpo anti-CSF1R con un marcador y/o un agente citotóxico. Como se usa en el presente documento, un marcador es un resto que facilita la detección del anticuerpo y/o facilita la detección de una molécula a la que se une el anticuerpo. Las etiquetas a modo de ejemplo no limitantes, incluyen, pero sin limitación, radioisótopos, grupo fluorescentes, grupos enzimáticos, grupos quimioluminiscentes, biotina, etiquetas de epítomos, etiquetas de unión de metal, etc. Un experto en la materia puede seleccionar un marcador adecuado de acuerdo con la aplicación prevista.

Como se usa en el presente documento, un agente citotóxico es un resto que reduce la capacidad proliferativa de una o más células. Una célula tiene capacidad de proliferación reducida cuando la célula se vuelve menos capaz de proliferar, por ejemplo, debido a que la célula experimenta apoptosis o muere, la célula no avanza a lo largo del ciclo celular y/o no se divide, la célula se diferencia, etc. Agentes citotóxicos a modo de ejemplo no limitantes, incluyen, pero sin limitación, radioisótopos, toxinas y agentes quimioterapéuticos. Un experto en la materia puede seleccionar un agente citotóxico adecuado de acuerdo con la aplicación prevista.

En algunas realizaciones, un marcador y/o un agente citotóxico se conjuga con un anticuerpo usando métodos químicos *in vitro*. Los métodos químicos de conjugación a modo de ejemplo no limitantes, son conocidos en la técnica e incluyen servicios, métodos y/o reactivos comercialmente disponibles de, por ejemplo, Thermo Scientific Life Science Research Produces (formerly Pierce; Rockford, IL), Prozyme (Hayward, CA), SACRI Antibody Services (Calgary, Canada), AbD Serotec (Raleigh, NC), etc. En algunas realizaciones, cuando un marcador y/o agente citotóxico es un polipéptido, el marcador y/o el agente citotóxico pueden expresarse desde el mismo vector de expresión con al menos una cadena de anticuerpo para producir un polipéptido que comprende el marcador y/o el agente citotóxico fusionados a una cadena de anticuerpo. Un experto en la materia puede seleccionar un método adecuado para conjugar un marcador y/o un agente citotóxico con un anticuerpo de acuerdo con la aplicación prevista.

Secuencias Líderes a modo de ejemplo

Para que algunas proteínas secretadas se expresen y segreguen en grandes cantidades, puede ser deseable una secuencia líder de una proteína heteróloga. En algunas realizaciones, se selecciona una secuencia líder de las SEQ ID NO: 3 y 4, que son secuencias líder de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente. En algunas realizaciones, el empleo de secuencias líder heterólogas puede ser ventajoso porque un polipéptido maduro resultante puede permanecer sin alterar a medida que la secuencia líder se elimina en el RE durante el proceso de secreción. La adición de una secuencia líder heteróloga puede ser necesaria para expresar y segregar algunas proteínas.

Se describen ciertas secuencias de secuencia líder a modo de ejemplo, por ejemplo, en la base de datos de secuencias líder en línea mantenida por el Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional de Singapur. Véase Choo et al., *BMC Bioinformatics*, 6: 249 (2005); y la publicación PCT N.º WO 2006/081430.

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos Anti-CSF1R

Se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden polinucleótidos que codifican una o más cadenas de anticuerpos anti-CSF1R. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo anti-CSF1R. En algunas realizaciones, una molécula

de ácido nucleico comprende tanto un polinucleótido que codifica una cadena pesada como un polinucleótido que codifica una cadena ligera, de un anticuerpo dirigido anti-CSF1R. En algunas realizaciones, una primera molécula de ácido nucleico comprende un primer polinucleótido que codifica una cadena pesada y una segunda molécula de ácido nucleico comprende un segundo polinucleótido que codifica una cadena ligera.

5 En algunas de dichas realizaciones, la cadena pesada y la cadena ligera se expresan a partir de una molécula de ácido nucleico, o a partir de dos moléculas de ácido nucleico separadas, como dos polipéptidos separados. En algunas realizaciones, tal como cuando un anticuerpo es un scFv, un solo polinucleótido codifica un único polipéptido que comprende tanto una cadena pesada como una cadena ligera unidas entre sí.

10 En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo anti-CSF1R comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, que, cuando se traduce, está ubicada en el extremo N de la cadena pesada o de la cadena ligera. Como se analiza anteriormente, la secuencia líder puede ser la secuencia líder nativa de la cadena pesada o ligera, o puede ser otra secuencia líder heteróloga.

15 Las moléculas de ácidos nucleicos pueden construirse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales en la técnica. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico es un vector de expresión que es adecuado para la expresión en una célula hospedadora seleccionada.

20 **Vectores de expresión y producción de Anticuerpos Anti-CSF1R**

Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican cadenas pesadas de anti-CSF1R y/o cadenas ligeras de anti-CSF1R. También se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican cadenas pesadas de anti-CSF1R y/o cadenas ligeras de anti-CSF1R. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, vectores de ADN, vectores de fagos, vectores virales, vectores retrovirales, etc. En algunas realizaciones, un vector comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena ligera. En algunas realizaciones, la cadena pesada y la cadena ligera se expresan a partir del vector como dos polipéptidos separados. En algunas realizaciones, la cadena pesada y la cadena ligera se expresan como parte de un único polipéptido, tal como, por ejemplo, cuando el anticuerpo es un scFv.

30 En algunas realizaciones, un primer vector comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada y un segundo vector comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera. En algunas realizaciones, el primer vector y el segundo vector se transfectan en células hospedadoras en cantidades similares (como cantidades molares similares o cantidades de masa similares). En algunas realizaciones, se transfecta una proporción molar o en masa de entre 5:1 y 1:5 del primer vector y el segundo vector en células hospedadoras. En algunas realizaciones, se utiliza una proporción en masa de entre 1:1 y 1:5 para el vector que codifica la cadena pesada y el vector que codifica la cadena ligera. En algunas realizaciones, se utiliza una proporción en masa de 1:2 para el vector que codifica la cadena pesada y el vector que codifica la cadena ligera.

40 En algunas realizaciones, se selecciona un vector que está optimizado para la expresión de polipéptidos en células CHO o derivadas de CHO o en células NSO. Se describen tales vectores a modo de ejemplo, por ejemplo, en Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004).

45 En algunas realizaciones, se elige un vector para la expresión *in vivo* de cadenas pesadas de anti-CSF1R y/o cadenas ligeras de anti-CSF1R en animales, incluyendo seres humanos. En algunas de dichas realizaciones, la expresión del polipéptido está bajo el control de un promotor que funciona de una manera específica de tejido. Por ejemplo, se describen los promotores específicos de hígado, por ejemplo, en la publicación PCT N.º WO 2006/076288.

50 **Células hospedadoras**

En diversas realizaciones, las cadenas pesadas de anti-CSF1R y/o las cadenas ligeras de anti-CSF1R pueden expresarse en células procariontas, tales como células bacterianas; o en células eucariotas, tales como células de hongos (tales como levaduras), células vegetales, células de insecto o células de mamífero. Tal expresión puede llevarse a cabo, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Las células eucariotas a modo de ejemplo que se pueden usar para expresar polipéptidos incluyen, pero sin limitación, células COS, incluyendo células COS 7; células 293, incluyendo células 293-6E; células CHO, incluyendo células COS-S y DG44; células PER.C6® (Crucell); y células NSO. En algunas realizaciones, las cadenas pesadas de anti-CSF1R y/o las cadenas ligeras de anti-CSF1R pueden expresarse en levaduras. Véase, por ejemplo, la Publicación de EE.UU. N.º US 2006/0270045 A1. En algunas realizaciones, se selecciona una célula hospedadora eucariota particular en función de su capacidad para realizar modificaciones postraduccionales deseadas en las cadenas pesadas de anti-CSF1R y/o cadenas ligeras de anti-CSF1R. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las células CHO producen polipéptidos que tienen un mayor nivel de sialilación que el mismo polipéptido producido en células 293.

65 La introducción de uno o más ácidos nucleicos en una célula hospedadora deseada se puede realizar por cualquier método, incluyendo, pero sin limitación, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada con DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, etc. Se describen métodos a

modo de ejemplo no limitantes, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Los ácidos nucleicos pueden transfectarse de forma transitoria o estable en las células hospedadoras deseadas, de acuerdo con cualquier método adecuado.

5 En algunas realizaciones, pueden producirse uno o más polipéptidos *in vivo* en un animal que ha sido modificado genéticamente o transfectado con una o más moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, de acuerdo con cualquier método adecuado.

Purificación de Anticuerpos anti-CSF1R

10 Los anticuerpos anti-CSF1R pueden purificarse mediante cualquier método adecuado. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, el uso cromatografía de afinidad en matrices o de interacción hidrófoba. Los ligandos de afinidad adecuados incluyen el CSF1R ECD y ligandos que se unen a regiones constantes de anticuerpo. Por ejemplo, se puede usar una proteína A, proteína G, proteína A/G, o una columna de afinidad de anticuerpos para unir la región constante y para purificar un anticuerpo anti-CSF1R. La cromatografía de interacción hidrófoba, por ejemplo, una
15 purificación de polipéptidos son conocidos en la técnica.

Producción libre de células de Anticuerpos anti-CSF1R

20 En algunas realizaciones, se produce un anticuerpo anti-CSF1R en un sistema libre de células. Se describen sistemas libres de células a modo de ejemplo no limitantes, por ejemplo, en Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

Composiciones Terapéuticas y Métodos

25 **Métodos para Tratar Enfermedades usando Anticuerpos Anti-CSF1R**

Los anticuerpos de la invención y las composiciones que comprenden anticuerpos de la invención, se proporcionan para su uso en métodos de tratamiento para seres humanos o animales. También se divulgan métodos para tratar
30 enfermedades que comprenden administrar anticuerpos anti-CSF1R. Las enfermedades a modo de ejemplo no limitantes, que pueden tratarse con anticuerpos anti-CSF1R incluyen, pero sin limitación, RA, MS, cáncer, pérdida ósea osteolítica inducida por metástasis, trastornos osteolíticos y pérdida ósea inducida por hipercalcemia.

35 En algunas realizaciones, el tratamiento es para afecciones inflamatorias. En algunas realizaciones, una afección inflamatoria se selecciona de la psoriasis, LES(lupus), EPOC, dermatitis atópica y aterosclerosis, síndrome de activación de macrófagos, e histiocitosis X.

En algunas realizaciones, una afección inflamatoria se selecciona de: enfermedad vascular proliferativa, síndrome de la dificultad respiratoria aguda, toxicidad mediada por citoquinas, toxicidad por interleucina-2, apendicitis, úlceras
40 pépticas, gástricas y duodenales, peritonitis, pancreatitis, colitis ulcerativa, pseudomembranosa, aguda e isquémica, diverticulitis, epiglotitis, acalasia, colangitis, colecistitis, hepatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, enteritis, enfermedad de Whipple, asma, alergia, shock anafiláctico, enfermedad del complejo inmunitario, isquemia de órganos, lesión por reperfusión, necrosis de órganos, fiebre del heno, sepsis, septicemia, shock endotóxico, caquexia, hiperpirexia, granuloma eosinofílico, granulomatosis, sarcoidosis, aborto séptico, epididimitis,
45 vaginitis, prostatitis, uretritis, bronquitis, enfisema, rinitis, fibrosis quística, neumonitis, alveolitis, bronquiolitis, faringitis, pleuresía, sinusitis, gripe, infección por el virus sincitial respiratorio, infección por herpes, infección por VIH, infección por el virus de la hepatitis B, infección por el virus de la hepatitis C, bacteremia diseminada, fiebre del dengue, candidiasis, malaria, filariasis, amibiasis, quistes hidatídicos, enfermedad de vagabundo, dermatitis, dermatomiositis, quemadura solar, urticaria, verrugas, ronchas, vasculitis, angeítis, endocarditis, arteritis, aterosclerosis,
50 tromboflebitis, pericarditis, miocarditis, isquemia miocárdica, periarteritis nodosa, fiebre reumática, enfermedad de Alzheimer, enfermedad celíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, meningitis, encefalitis, infarto cerebral, embolia cerebral, síndrome de Guillain-Barre, neuritis, neuralgia, lesión de la médula espinal, parálisis, uveítis, artritis, artralgias, osteomielitis, fascitis, enfermedad de Paget, gota, enfermedad periodontal, sinovitis, miastenia grave, tiroiditis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, síndrome de Behcet, rechazo de aloinjertos,
55 enfermedad del injerto contra el huésped, espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, enfermedad de Berger, síndrome de Reiter y enfermedad de Hodgkin, o en el tratamiento de la inflamación asociada con estas afecciones.

En algunas realizaciones, el tratamiento es de cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer que secreta
60 CSF1. En algunas realizaciones, el cáncer es uno o más cánceres seleccionados de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas, melanoma maligno uveal, linfoma folicular, carcinoma de células renales, cáncer de cuello uterino y cáncer de ovario. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CSF1R es útil para tratar uno o más cánceres seleccionados de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cerebro, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer
65 de hígado, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, melanoma, astrocitoma, cáncer de estómago y adenocarcinoma pulmonar.

Rutas de administración y vehículos

5 En diversas realizaciones, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse *in vivo* por varias vías, incluyendo, pero sin limitación, oral, intraarterial, parenteral, intranasal, intramuscular, intracardiaca, intraventricular, intratraqueal, bucal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, tópica, transdérmica e intratecal, o de otro modo por implantación o inhalación. Las composiciones objeto se pueden formular en preparaciones en formas sólida, semisólida, líquida o gaseosa; incluyendo, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, enemas, inyecciones, inhaladores y aerosoles. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CSF1R
10 puede revestirse sobre micropartículas de oro y administrarse por vía intradérmica mediante un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola de genes", como se describe en la literatura (véase, por ejemplo, Tang et al., *Nature* 356:152-154 (1992)). La formulación y la vía de administración apropiadas se pueden seleccionar de acuerdo con la aplicación prevista.

15 En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden anticuerpos anti-CSF1R se proporcionan en formulaciones con una amplia variedad de vehículos farmacéuticamente aceptables (véase, por ejemplo, Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 20^a ed. (2003); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7^a ed., Lippencott Williams y Wilkins (2004); Kibbe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3^a ed, Pharmaceutical Press (2000)). Se encuentran disponibles
20 diversos excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos, adyuvantes y diluyentes. Además, también están disponibles diversas sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste de pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares. Los excipientes a modo de ejemplo incluyen sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

25 En diversas realizaciones, las composiciones que comprenden anticuerpos anti-CSF1R pueden formularse para inyección, incluyendo administración subcutánea, disolviendo, suspendiendo o emulsionando las mismas en un disolvente acuoso o no acuoso, tales como aceites vegetales u otros, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales, tales como solubilizantes,
30 agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes. En diversas realizaciones, las composiciones pueden formularse para inhalación, por ejemplo, utilizando propulsores presurizados aceptables como el diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. Las composiciones también se pueden formular, en diversas realizaciones, en microcápsulas de liberación sostenida, tales como con polímeros biodegradables o no biodegradables. Una formulación biodegradable a modo de ejemplo no limitante, incluye polímero
35 de ácido poliláctico-ácido glicólico. Una formulación no biodegradable a modo de ejemplo no limitante, incluye un éster de ácido graso de poliglicerina. Se describen ciertos métodos para hacer tales formulaciones, por ejemplo, en el documento EP 1 125 584 A1.

40 También se proporcionan paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes, cada uno de los cuales contiene una o más dosis de un anticuerpo anti-CSF1R. En algunas realizaciones, se proporciona una dosis unitaria en la que la dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de una composición que comprende un anticuerpo anti-CSF1R, con o sin uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, dicha dosis unitaria se suministra en una jeringa precargada de un solo uso para inyección. En diversas realizaciones, la composición
45 contenida en la dosis unitaria puede comprender solución salina, sacarosa o similares; un tampón, tal como fosfato o similares; y o formularse dentro de un intervalo de pH estable y eficaz. Como alternativa, en algunas realizaciones, la composición puede proporcionarse como un polvo liofilizado que puede reconstituirse mediante la adición de un líquido apropiado, por ejemplo, agua estéril. En algunas realizaciones, la composición comprende una o más sustancias que inhiben la agregación de proteínas, incluyendo, pero sin limitación, sacarosa y arginina. En algunas realizaciones, una
50 composición de la invención comprende heparina y/o un proteoglicano.

Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento o la profilaxis de la indicación específica. La cantidad terapéuticamente eficaz suele depender del peso del sujeto que se está tratando, su condición física o de salud, la extensión de la afección a tratar o la edad del sujeto que se está tratando. En general, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 10 µg/kg de
55 peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal a aproximadamente
60 10 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por dosis.

Las composiciones de anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse a los sujetos según sea necesario. La
65 determinación de la frecuencia de administración puede ser realizada por personas expertas en la técnica, como por ejemplo un médico de cabecera basándose en las consideraciones de la afección a tratar, la edad del sujeto a tratar,

la gravedad de la afección a tratar, el estado general de salud del sujeto a tratar y similares. En algunas realizaciones, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-CSF1R a un sujeto una o más veces. En diversas realizaciones, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-CSF1R al sujeto una vez al mes, más de una vez la mes, tal como, por ejemplo, cada dos meses o cada tres meses. En otras realizaciones, se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-CSF1R al sujeto menos de una vez al mes, tal como, por ejemplo, cada dos semanas o todas las semanas. Se administra una dosis eficaz de un anticuerpo anti-CSF1R al sujeto al menos una vez. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de un anticuerpo anti-CSF1R se puede administrar varias veces, incluso durante períodos de al menos un mes, al menos seis meses o al menos un año.

10 Terapia de combinación

Los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse solos o con otros modos de tratamiento. Pueden proporcionarse antes, sustancialmente al mismo tiempo con, o después de otros modos de tratamiento, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia o administración de un producto biológico, tal como otro anticuerpo terapéutico. Para el tratamiento de artritis reumatoide, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, metotrexato, agentes anti-TNF como Remicade, Humira, Simponi y Enbrel; glucocorticoides tales como prednisona, Leflunomida; Azatioprina; inhibidores de JAK tales como CP 590690; inhibidores de SYK tales como R788; anticuerpos anti-IL-6; anticuerpos anti-IL-6R; anticuerpos anti-CD-20; anticuerpos anti-CD19; anticuerpos anti-GM-CSF; y anticuerpos anti-GM-CSF-R. Para el tratamiento de la esclerosis múltiple, los anticuerpos anti-CSF1R pueden administrarse con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, interferón alfa; interferón beta; prednisona; anticuerpos anti-integrina alfa 4 tales como Tysabri; anticuerpos anti-CD20 tales como Rituxan; FTY720 (Fingolimod); y Cladribina (Leustatin).

25 Ejemplos

Los ejemplos que se analizan a continuación están destinados a ser puramente a modo de ejemplo de la invención y no deben considerarse limitantes de la invención de ninguna manera. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Celsius y la presión es o está cerca de la atmosférica.

35 Ejemplo 1: Selección de los Fab que se unen al dominio extracelular CSF1R (ECD)

Los ratones se inmunizaron con una fusión de Fc con el dominio extracelular de CSF1R humano, hCSF1R ECD.506-Fc (SEQ ID NO: 6). Se aislaron bazo de ratones inmunizados y se creó una biblioteca de presentación en fagos de Fab a partir de los esplenocitos. Los fagos que expresan Fab se seleccionaron para unirse a CSF1R ECD humano. Los Fab de fagos de unión positiva se expresaron y se purificaron a partir de bacterias. Se seleccionaron un total de 1056 clones Fab para su posterior análisis.

Los Fab se analizaron para determinar la capacidad de unirse a CSF1R ECD humano, bloquear la unión de CSF1 humano a CSF1R ECD humano, y bloquear la unión de IL34 humana a CSF1R ECD humano. A continuación, se realizó el análisis de secuencia y la clasificación de los Fab que se seleccionaron de ese análisis y se seleccionaron ciertos Fab únicos.

Se analizaron adicionalmente los Fab únicos para determinar la capacidad de unirse a CSF1R ECD humano, la capacidad de unirse a CSF1R ECD de cynomolgus, y la capacidad de unirse a CSF1R ECD de ratón. Los Fab también se analizaron para determinar la capacidad de bloquear la unión de CSF1 humano a CSF1R ECD humano y la capacidad de bloquear la unión de IL34 humana a CSF1R ECD humano y la capacidad de inhibir la fosforilación de CSF1R inducida por ligando en presencia de CSF1 o IL34. (No se muestran los datos).

50 Ejemplo 2: Reformateo de los Fab anti-CSF1R para hacer anticuerpos quiméricos

Tras la caracterización de Fab, se seleccionaron once de los Fab para cambiar el formato a anticuerpos quiméricos. Cada Fab se cambia de formato a un anticuerpo quimérico que comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana con la mutación S241P y una región constante de cadena ligera κ humana. Brevemente, las regiones VH de Fab se clonaron y expresaron a partir del vector pTT5 (Biotechnology Research Institute, Montreal, Canadá; and National Research Research Council of Canada, Ottawa, Canada) modificado para contener una secuencia líder de IgH de ratón (SEQ ID NO: 4) y una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana con la mutación S241P (SEQ ID NO: 94). Las regiones VL de Fab se clonaron y expresaron a partir del vector pTT5 modificado para contener una secuencia líder de Igk de ratón (SEQ ID NO: 3) y una región constante de cadena ligera de Igk humana (SEQ ID NO: 95). Las regiones V de Fab se insertaron de tal manera que no introdujeran secuencias de aminoácidos no derivadas de anticuerpos en las proteínas finales.

65 Ejemplo 3: Expresión y caracterización de anticuerpos quiméricos

Los anticuerpos quiméricos se expresaron de forma transitoria y se purificaron sustancialmente como se describe a continuación en el Ejemplo 5.

- 5 Los 11 anticuerpos quiméricos se analizaron para determinar su unión a CSF1R ECD humano, de cynomolgus y de ratón. Los anticuerpos quiméricos también se analizaron para determinar la capacidad de bloquear la unión de CSF1 humano a CSF1R ECD humano, la capacidad de bloquear la unión de IL34 humana a CSF1R ECD humano, la capacidad de bloquear la unión de CSF1 humano a CSF1R ECD de cynomolgus y la capacidad de inhibir la fosforilación de CSF1R inducida por ligando en presencia de CSF1 o IL34. Los anticuerpos quiméricos se analizaron adicionalmente para determinar la unión a CSF1R en la superficie de las células. Finalmente, los anticuerpos quiméricos se analizaron para confirmar que no inducen la fosforilación de CSF1R en ausencia de ligando. (No se muestran los datos).

Ejemplo 4: Humanización de anticuerpos anti-CSF1R

- 15 De los análisis descritos anteriormente, se seleccionaron los anticuerpos quiméricos anti-CSF1R 0301, 0302 y 0311 para la humanización. Los anticuerpos se humanizaron cambiando ciertos restos de aminoácidos en las regiones marco de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. Los criterios utilizados para la humanización fueron como se describe anteriormente, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos n.º US 2009/0136500.
- 20 Para cAb 0301, se diseñaron tres regiones variables de cadena pesada humanizadas y dos regiones variables de cadena ligera humanizadas, para un total de seis anticuerpos humanizados, Ab1 a Ab6. Para cAb 0302, se diseñaron dos regiones variables de cadena pesada humanizadas y tres regiones variables de cadena ligera humanizadas, para un total de seis anticuerpos humanizados, Ab7 a Ab12. Para cAb 0311, se diseñaron dos regiones variables de cadena pesada humanizadas y dos regiones variables de cadena ligera humanizadas, para un total de cuatro anticuerpos humanizados, Ab13 a Ab16.

30 Las secuencias para cada una de las regiones variables de cadena pesada humanizada y las regiones variables de cadena ligera humanizada, alineadas con las secuencias de las regiones variables del anticuerpo quimérico parental y las secuencias de las regiones marco del aceptor humano se muestran en las Figuras 1 (cadenas pesadas) y 2 (cadenas ligeras). Los cambios en las secuencias de las regiones variables humanizadas en relación con las secuencias de la región marco variable del aceptor humano están recuadrados. Cada una de las CDR para cada una de las regiones variables se muestra en una región en caja, y se etiqueta como "CDR" sobre las secuencias en caja.

35 La Tabla 8, a continuación, muestra las secuencias completas para las cadenas pesadas humanizadas y cadenas ligeras humanizadas de los anticuerpos Ab1 a Ab16. En la Tabla 2 se muestra el nombre y las SEQ ID NO de la cadena pesada humanizada y la cadena ligera humanizada de cada uno de esos anticuerpos.

Tabla 2: Cadenas pesadas y cadenas ligeras humanizadas de Ab1 a Ab16

Anticuerpo humanizado	HC Humanizada	SEQ ID NO	LC Humanizada	SEQ ID NO
Ab1	h0301-H0	53	h0301-L0	60
Ab2	h0301-H1	54	h0301-L0	60
Ab3	h0301-H2	55	h0301-L0	60
Ab4	h0301-H0	53	h0301-L1	61
Ab5	h0301-H1	54	h0301-L1	61
Ab6	h0301-H2	55	h0301-L1	61
Ab7	h0302-H1	56	h0302-L0	62
Ab8	h0302-H1	56	h0302-L1	63
Ab9	h0302-H1	56	h0302-L2	64
Ab10	h0302-H2	57	h0302-L0	62
Ab11	h0302-H2	57	h0302-L1	63
Ab12	h0302-H2	57	h0302-L2	64
Ab13	h0311-H1	58	h0311-L0	65
Ab14	h0311-H1	58	h0311-L1	66
Ab15	h0311-H2	59	h0311-L0	65
Ab16	h0311-H2	59	h0311-L1	66

- 40 **Ejemplo 5: Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados se unen a CSF1R ECD humano y de cynomolgus, pero no a CSF1R ECD de ratón**

Los 16 anticuerpos humanizados se expresaron transitoriamente en células CHO, del siguiente modo. Las células CHO-3E7 se cotransfectaron con plásmidos de expresión de cadenas pesadas y ligeras individuales en una proporción

de masa de 1 plásmido de cadena pesada a 2 plásmidos de cadena ligera usando polietilenimina (PEI) en una proporción de ADN:PEI de 1:5. El ADN total utilizado por transfección fue de 1,5 µ /ml de células.

5 Los anticuerpos humanizados se purificaron a partir de sobrenadantes de células transfectadas utilizando columnas HiTrap Protein A HP (GE Healthcare), seguido de purificación adicional utilizando columnas Phenyl HP (GE Healthcare). Los sobrenadantes que contenían anticuerpos se cargaron en columnas HiTrap Protein A HP pre-equilibradas con PBS/NaCl 0,5M. Las columnas cargadas con anticuerpos se lavaron con 10 volúmenes de columna PBS/NaCl 0,5 M, y se eluyeron con un gradiente de paso lineal mixto de glicina 0,1 M, pH 2,7/NaCl 0,5 M directamente en 100 µl de tampón Tris 1 M, pH 8,0. Los eluatos que contenían anticuerpos se dializaron contra PBS, después de lo
10 cual se añadió (NH₄)₂SO₄ 2,4 M (Sigma) para lograr una conductividad igual a la del fosfato de potasio 10 mM pH 7,0/(NH₄)₂SO₄ 1,2 M. Los anticuerpos se cargaron a continuación en columnas de Phenyl HP de 1 ml (GE Healthcare) previamente equilibradas con fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0/(NH₄)₂SO₄ 1,2 M. Las columnas cargadas con anticuerpos se lavaron con 15 volúmenes de columna de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0/ (NH₄)₂SO₄ 1,2 M, y se eluyeron con un gradiente de volumen de 20 columnas de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0. Las fracciones que
15 contenían anticuerpos se agruparon y se dializaron contra PBS.

Los anticuerpos humanizados, junto con sus anticuerpos quiméricos parentales (cAbs), se analizaron para determinar su unión a CSF1R ECD humano, de cynomolgus y de ratón, del siguiente modo.

20 *Actividad de Unión de CSF1R Humano*

Se recubrieron noventa y seis pocillos de placas ELISA de fondo claro durante la noche con 1 µg/ml de hCSF1R ECD.506-Fc recombinante (SEQ ID NO: 6; FivePrime Therapeutics) o quimera humana M-CSF R Fc (R&D Systems) en PBS. A la mañana siguiente, se lavaron los pocillos cuatro veces con Tween20 al 0,05 % en PBS (PBST) y se
25 bloquearon con Blocker-Blotto (Pierce). Se agregaron cincuenta µl de 0,5x diluciones en serie del anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico parental, comenzando con 2000 ng/ml, diluido 1:1 en Blocker-Blotto, a los pocillos recubiertos con CSF1R. Después de la incubación a temperatura ambiente (RT) durante 90 minutos, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBST y se añadió a cada pocillo una dilución 1:5000 de un anticuerpo de cadena ligera kappa anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa (Sigma). Después de la incubación a temperatura ambiente
30 durante 60 min, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBST y se agregaron 50 µl de sustrato de dihidrocloruro de o-fenilendiamina peroxidasa (Sigma) a cada pocillo. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min, se leyeron los valores A450 de cada pocillo directamente en un espectrofotómetro SpectraMaxPlus con el software SoftMaxPro (Molecular Devices).

35 Los resultados de ese experimento se muestran en la figura 3. Todos los anticuerpos humanizados se unieron a CSF1R ECD humano dentro del intervalo de concentraciones analizado.

Curva de unión a CSFR1 de Cynomolgus

40 La curva de unión para cada anticuerpo humanizado que se une a CSF1R ECD de cynomolgus se determinó como se describe anteriormente para CSF1R humano, excepto que los pocillos de las placas de ELISA de fondo claro se recubrieron durante la noche con 2 µg/ml de cynoCSF1R ECD-Fc recombinante (FivePrime Therapeutics, SEQ ID NO: 8, pero sin la secuencia líder de 19 aminoácidos).

45 Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 4. Todos los anticuerpos humanizados se unieron a CSF1R ECD de cynomolgus dentro del intervalo de concentraciones analizado.

Curva de unión a CSFR1 de ratón

50 La curva de unión para cada anticuerpo humanizado que se une a CSF1R ECD de ratón se determinó como se describe anteriormente para CSF1R humano, excepto que los pocillos de las placas de ELISA de fondo claro se recubrieron durante la noche con 2 µg/ml de mCSF1R ECD-Fc recombinante (FivePrime Therapeutics, SEQ ID NO: 93).

55 Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 5. Ninguno de los anticuerpos humanizados, o de los anticuerpos quiméricos parentales, se unieron de forma detectable a CSF1R ECD de ratón en el intervalo de concentraciones analizadas.

Cálculo de EC50

60 La Tabla 3 muestra las EC50, calculadas utilizando el algoritmo de análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) del software GraphPad Prism (software GraphPad) para cada unión de anticuerpo humanizado a CSF1R ECD humano y a CSF1R ECD de cynomolgus. Debido a que ninguno de los anticuerpos quiméricos se unió de manera detectable a CSF1R ECD de ratón, no se pudo calcular una EC50 a partir de esos datos. La tabla 3 también incluye las EC50
65 calculadas para los anticuerpos quiméricos parentales.

Tabla 3: Actividad de unión de anticuerpos anti-CSF1R humanizados

Anticuerpo humanizado	EC50 de CSF1R ECD Humano(ng/ml)	EC50 de CSF1R ECD de Cynomolgus (ng/ml)
cAb 0301	11,4	15,18
h0301-L0H0	13,4	15,11
h0301-L0H1	14,23	14,39
h0301-L0H2	14,77	13,79
h0301-L1H0	13,35	11,93
h0301-L1H1	16,47	16,66
h0301-L1H2	16,23	16,59
cAb 0302	15,94	17,34
h0302-L0H1	14,64	466,5
h0302-L1H1	21,43	1058
h0302-L2H1	7,741	66,04
h0302-L0H2	17,85	154,9
h0302-L1H2	22,1	172,5
h0302-L2H2	10,15	17,96
cAb 0311	17,65	20,06
h0311-L0H1	13,12	21,65
h0311-L1H1	14,32	30,88
h0311-L0H2	11,54	17,47
h0311-L1H2	13,26	20,27

Ejemplo 6: Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados inhiben la fosforilación de CSF1R inducida por ligando

- 5 CSF1R se fosforila en presencia de los ligandos CSF1 o IL34. Los anticuerpos humanizados, junto con sus anticuerpos quiméricos parentales (cAbs), se analizaron para determinar su capacidad para inhibir la fosforilación de CSF1R inducida por cualquiera de los ligandos, del siguiente modo.

Inhibición de la fosforilación inducida por CSF1

- 10 Se incubaron células CHO transfectadas con CSF1R (SEQ ID NO: 2) con diluciones en serie de cada anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico parental, comenzando a 8 µg/ml, durante 60 minutos en hielo, después de lo cual, se añadió CSF1 humano 3,3 nM (M-CSF, R & D Systems) a las células. (Para la serie 0301 de anticuerpos humanizados, se utilizaron diluciones en serie a partir de 2 µg/ml de anticuerpo humanizado y anticuerpo quimérico parental). Las células se incubaron durante 3 minutos a 37°C y a continuación, se lisaron mediante la adición de 1/10x de volumen de 10x de tampón de lisis celular (Cell Signaling Technology). La cantidad de CSF1R fosforilado en los lisados celulares se cuantificó utilizando un kit ELISA de fosfo-M-CSF R humano (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 20 Los resultados de ese experimento se muestran en las figuras 6A a 6C. Todos los anticuerpos humanizados fueron capaces de inhibir la fosforilación inducida por CSF1 humana de CSF1R ECD humano dentro del intervalo de concentraciones analizadas.

Inhibición de la fosforilación inducida por IL34

- 25 Se incubaron células CHO transfectadas con CSF1R (SEQ ID NO: 2) 0,002 a 8 µg/ml de cada anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico parental durante 60 minutos en hielo, después de lo cual, se añadió IL34 humana 3,3 nM (FivePrime Therapeutics; SEQ ID NO: 68) a las células. Las células se incubaron durante 3 minutos a 37°C y a continuación, se lisaron mediante la adición de 1/10x de volumen de 10x de tampón de lisis celular (Cell Signaling Technology). La cantidad de CSF1R fosforilado en los lisados celulares se cuantificó utilizando un kit ELISA de fosfo-M-CSF R humano (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 35 Los resultados de ese experimento se muestran en las figuras 7A a 7C. Todos los anticuerpos humanizados fueron capaces de inhibir la fosforilación inducida por IL34 humana de CSF1R humano dentro del intervalo de concentraciones analizadas.

Ejemplo 7: Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados bloquean la unión de CSF1 humano e IL34 humana a CSF1R humano y de cynomolgus

- 40 *Actividad de bloqueo de CSF1/CSF1R humano*

Los anticuerpos humanizados, junto con sus anticuerpos quiméricos parentales (cAbs), se analizaron para determinar su capacidad para bloquear la unión de CSF1 humano a CSF1R ECD humano y de cynomolgus, del siguiente modo.

El CSF1 humano recombinante (M-CSF; R&D Systems) se biotiniló utilizando un kit de etiquetado de biotina NH2 (Dojindo Molecular Technologies). Se añadieron cien µl de 1 µg/ml de CSF1 biotinilado en PBST/BSA al 0,1 % a los pocillos de las placas recubiertas con estreptavidina Reacti-Bind (Pierce) previamente bloqueadas con tampón de bloqueo SuperBlock (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cincuenta µl de 0,5x diluciones en serie del anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico parental, comenzando con 2000 ng/ml, se incubaron con 50 ng/ml de hCSF1R ECD.506-Fc (SEQ ID N°: 6; FivePrime Therapeutics) o 50 ng/ml de cynoCSF1R ECD-Fc (FivePrime Therapeutics, SEQ ID NO: 8, pero sin la secuencia líder de 19 aminoácidos) en 100 µl de PBST/BSA al 0,1 % durante 90 min a temperatura ambiente, después de lo cual el aditivo se transfirió a uno o más pocillos de una placa recubierta de ligando. Después de 90 min a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con PBST y se añadió a cada pocillo una dilución 1:5000 de una IgG antihumana de cabra conjugada con peroxidasa específica del fragmento Fc (Jackson Immuno Research) en PBST/BSA al 0,1 %. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 60 min, los pocillos se lavaron con PBST/BSA al 0,1 %, y se añadió a cada pocillo sustrato de diclorhidrato de o-fenilendiamina peroxidasa (Sigma). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min, se leyeron los valores A450 de cada pocillo directamente en un espectrofotómetro SpectraMaxPlus con el software SoftMaxPro (Molecular Devices).

Los resultados de ese experimento para CSFR1 de cynomolgus se muestran en las figuras 8A a 8C. Todos los anticuerpos humanizados basados en Fab 0301 y 0311 fueron capaces de bloquear la unión de CSF1 humana a CSF1R ECD de cynomolgus dentro del rango de concentraciones analizadas. Ninguno de los anticuerpos humanizados basados en Fab 0302 mostró una actividad de bloqueo similar en ese experimento en comparación con la actividad de bloqueo de cAb 0302.

Actividad de bloqueo de IL34/CSF1R humano

Los anticuerpos humanizados se analizaron para determinar su capacidad para bloquear la unión de IL34 humana a CSF1R ECD humano. La actividad de bloqueo de cada anticuerpo humanizado se determinó como se describe anteriormente para el bloqueo de CSF1, excepto que la IL34 humana recombinante (FivePrime Therapeutics; SEQ ID NO: 68) se biotiniló utilizando un kit de etiquetado de biotina NH2 (Dojindo Molecular Technologies) y a continuación se añadieron 100 µl de 1 µg/ml de IL34 recombinante biotinilada en PBST/BSA al 0,1 % a los pocillos de las placas recubiertas con estreptavidina Reacti-Bind (Pierce) previamente bloqueadas con tampón de bloqueo SuperBlock (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados de ese experimento para CSFR1 de cynomolgus se muestran en las figuras 9A a 9C. Todos los anticuerpos humanizados basados en Fab 0301 y 0311 fueron capaces de bloquear la unión de IL34 humana a CSF1R ECD de cynomolgus dentro del rango de concentraciones analizadas. Ninguno de los anticuerpos humanizados basados en Fab 0302 mostró una actividad de bloqueo similar en ese experimento en comparación con la actividad de bloqueo de cAb 0302.

Cálculo de IC50

La Tabla 4 muestra las IC50, calculadas utilizando el algoritmo de análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) del software GraphPad Prism (software GraphPad), para la inhibición de la fosforilación de CSF1R inducida por ligando por cada anticuerpo humanizado. La Tabla 4 también muestra las IC50, calculadas utilizando el algoritmo de análisis de regresión no lineal (ajuste de curva) del software GraphPad Prism (software GraphPad), para el bloqueo de la unión del ligando a CSF1R ECD por cada anticuerpo humanizado. Finalmente, la Tabla 4 muestra el número de aminoácidos en las regiones marco de la cadena ligera y pesada de cada anticuerpo humanizado que se revirtieron al correspondiente resto de aminoácido de ratón. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado h0301L1H1 tiene un aminoácido en una región marco de cadena ligera que se mutó por reversión al aminoácido de ratón, y un aminoácido en las regiones marco de cadena pesada que se mutaron por reversión al aminoácido de ratón. Haciendo referencia a las figuras 1 y 2, el aminoácido mutado por reversión en la región marco de la cadena ligera está en la posición 1 en la región marco 1, y el aminoácido mutado por reversión en la cadena pesada está en la posición 71 en la región marco 3 según la numeración de Kabat (véase la Figura 1B).

Tabla 4: Actividad de bloqueo de anticuerpos anti-CSF1R humanizados

Anticuerpo humanizado	IC50 de CSF1 humano/CSF1R ECD Humano (ng/ml)	IC50 de IL34 humana/CSF1R ECD Humano (ng/ml)	IC50 de CSF1 humano/CynoCSF1R ECD (ng/ml)	IC50 de IL34 humana/CynoCSF1R ECD (ng/ml)	Restos de ratón mutados por reversión en FR (L+H)
cAb0301	307,2	312,2	22,01	29,53	
h0301-L0H0	1031	433	27,64	35,92	0 + 0
h0301-L0H1	778,1	452,6	27,45	36,43	0 + 1

h0301-L0H2	1317	480,9	28,05	37,37	0 + 4
h0301-L1H0	6150	378	25,53	34,84	1 + 0
h0301-L1H1	814,2	384,4	31,07	42,41	1 + 1
h0301-L1H2	682,1	397,1	27,77	36,53	1 + 4
cAb0302	263,5	350,8	33,09	49,38	
h0302-L0H1	927,7	615	15,55	2,00E=+12	0 + 2
h0302-L1H1	742	363,7	60,49	676,4	1 + 2
h0302-L2H1	384	303,1	89827	509,1	3 + 2
h0302-L0H2	438,2	474,2	ninguno	248,1	0 + 5
h0302-L1H2	597,8	495,3	1085	541,3	1 + 5
h0302-L2H2	354,4	240,1	837,6	278,7	3 + 5
cAb 0311	577	994,2	43,47	52,1	
h0311-L0H1	291,3	343,2	32,47	50,4	0 + 2
h0311-L1H1	507,5	667,4	24,68	53,69	2 + 2
h0311-L0H2	435,5	633,3	25,96	40,79	0 + 5
h0311-L1H2	419	578,2	30,76	48,56	2 + 5

Ejemplo 8: Constantes de unión del anticuerpo anti-CSF1R humanizado

5 La k_a , K_d , y K_D para la unión a CSF1R ECD humano se determinaron para cada uno de los anticuerpos humanizados como sigue.

10 La cinética de unión de los anticuerpos humanizados anti-CSF1R para CSF1R ECD se determinó utilizando la Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) Biacore T100 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NY). Cada uno de los anticuerpos anti-CSF1R humanizados se capturó en un chip sensor CM5 inmovilizado con anticuerpo IgG antihumano utilizando el kit de captura de anticuerpos humanos (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NY) a 150UR, de modo que el valor de $R_{máx}$ para la unión de hCSF1R ECD.506 (SEQ ID NO: 5) fue 100UR. Se recomiendan valores de $R_{máx}$ de menos de 150RU para determinar con precisión los valores cinéticos. Se usó solución salina tamponada con Hepes 10 mM, pH 7,4, con Tween20 al 0,05 % (HPS-P; GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NY) como tampón de migración y dilución. Se inyectó CSF1R ECD.506 a seis concentraciones (90 nM, 30 nM, 10 nM, 15 3,33 nM, 1.11 nM y 0 nM) durante 2 minutos y se observó la disociación durante 5 minutos para determinar los parámetros cinéticos de unión anticuerpo humanizado/hCSF1R ECD. La constante de asociación, la constante de disociación, la afinidad y la capacidad de unión de cada uno de los Fab para el CSF1R ECD humano se calcularon utilizando el paquete de software de evaluación Biacore T100 utilizando el modelo de unión 1:1.

20 Los resultados de las determinaciones cinéticas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Afinidad de unión a anticuerpos humanizados para CSF1R humano

huAbAb	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)
huAb 0301-L0H0	$3,22 \times 10^6$	$1,11 \times 10^{-03}$	0,35
huAb 0301-L0H1	$3,56 \times 10^6$	$1,22 \times 10^{-03}$	0,34
huAb 0301-L0H2	$2,32 \times 10^6$	$6,60 \times 10^{-04}$	0,28
huAb 0301-L1H0	$3,29 \times 10^6$	$1,15 \times 10^{-03}$	0,35
huAb 0301-L1H1	$2,87 \times 10^6$	$9,21 \times 10^{-04}$	0,32
huAb 0301-L1H2	$2,95 \times 10^6$	$7,42 \times 10^{-04}$	0,25
huAb 0302-L0H1	$3,54 \times 10^6$	$3,69 \times 10^{-03}$	1,04
huAb 0302-L1H1	$3,47 \times 10^6$	$4,04 \times 10^{-03}$	1,17
huAb 0302-L2H1	$1,60 \times 10^6$	$9,14 \times 10^{-04}$	0,57
huAb 0302-L0H2	$3,40 \times 10^6$	$1,79 \times 10^{-03}$	0,53
huAb 0302-L1H2	$2,71 \times 10^6$	$1,53 \times 10^{-03}$	0,56
huAb 0302-L2H2	$1,84 \times 10^6$	$8,40 \times 10^{-04}$	0,46
huAb 0311-L0H1	$1,22 \times 10^6$	$5,40 \times 10^{-04}$	0,44
huAb 0311-L1H1	$1,32 \times 10^6$	$6,64 \times 10^{-04}$	0,50
huAb 0311-L0H2	$1,34 \times 10^6$	$4,73 \times 10^{-04}$	0,35
huAb 0311-L1H2	$1,51 \times 10^6$	$6,09 \times 10^{-04}$	0,40

Todos menos dos de los anticuerpos humanizados mostraron afinidades de unión subnanomolares para CSF1R ECD humano y los dos anticuerpos humanizados restantes mostraron afinidades de unión para CSF1R ECD humano de menos de 2 nM.

5 Ejemplo 9: Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados bloquean la fosforilación de inducida por ligandos

Basándose en los datos anteriores, que incluyen la unión a CSF1R y la inhibición del ligando y la probabilidad de inmunogenicidad para cada anticuerpo humanizado, se seleccionaron tres anticuerpos humanizados para estudio adicional: 0301-L0F10, 0301-L1H0 y 0311-L0H1.

10 Después de confirmar que 0301-L0H0, 0301-L1H0 y 0311-L0H1 se unen cada uno a CSF1R en la superficie de las células (datos no mostrados), se probó cada uno de los anticuerpos para determinar la capacidad de bloquear la fosforilación de CSF1R inducida por ligandos en células CHO, como se describe en el Ejemplo 6.

15 Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 10. Los tres anticuerpos humanizados probados bloquearon la fosforilación de CSF1R tanto inducida por CSF1 (A) como inducida por IL34 (B) en células CHO. La Tabla 6 muestra la IC50 para el bloqueo de la fosforilación de CSF1R inducida por ligandos para cada anticuerpo.

Tabla 6: IC50 de bloqueo de la fosforilación inducida por ligando para anticuerpos humanizados

Anticuerpo humanizado	IC50 de bloqueo de CSF1 (ng/ml)	IC50 de bloqueo de IL34 (ng/ml)
0301-L0H0	305,4	340,8
0301-L1H0	213,2	242,2
0311-L0H1	127,2	337,6

20 **Ejemplo 10: Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados bloquean las respuestas de proliferación/supervivencia inducidas por ligandos de monocitos humanos primarios**

25 Los anticuerpos humanizados 0301-L0H0, 0301-L1H0 y 0311-L0H1 se probaron para determinar su capacidad para bloquear las respuestas de proliferación/supervivencia de monocitos inducidas por ligandos de la siguiente manera.

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de sangre de un donante sano mediante centrifugación en un cojín Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se aislaron monocitos de sangre periférica de la fracción de PBMC recuperada mediante centrifugación en un cojín Percoll™ al 48,5 % (GE Healthcare Bio-Sciences). Después de la recuperación del cojín Percoll™, los monocitos de sangre periférica purificados se estimularon con CSF1 humano recombinante 162 pM o IL34 humana recombinante 1,6 nM (ambos de R&D Systems) en presencia o ausencia de diluciones en serie del anticuerpo humanizado 0301-L0H0, anticuerpo humanizado 0301-L1H0 o anticuerpo humanizado 0311-L0H1. Después de incubación a 37 °C durante 48 horas, el contenido de ATP celular relativo de cada cultivo individual se evaluó utilizando el reactivo CellTiter-Glo® (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este ensayo, el contenido de ATP celular relativo es directamente proporcional al número de células viables en cultivo, y por lo tanto, refleja las respuestas de proliferación/supervivencia de monocitos.

40 Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 11. Los tres anticuerpos humanizados probados fueron capaces de bloquear las respuestas de proliferación/supervivencia de monocitos después de la estimulación con CSF1 (A) o IL34 (B). La Tabla 7 muestra la IC50 para el bloqueo de las respuestas de proliferación/supervivencia de monocitos inducidas por ligandos para cada anticuerpo. Los valores mostrados en la Tabla 7 representan el intervalo observado de los tres donantes primarios diferentes evaluados.

45 Tabla 7: IC50 de bloqueo de proliferación/supervivencia de monocitos para anticuerpos humanizados

Anticuerpo humanizado	IC50 de bloqueo de CSF1 (ng/ml)	IC50 de bloqueo de IL34 (ng/ml)
0301-L0H0	31,9-77,5	12,2-29,9
0301-L1H0	19,0-71,9	10,5-30,6
0311-L0H1	75,9-134,8	26,9-152,2

Ejemplo 11: Los anticuerpos anti-CSF1R humanizados no estimulan directamente las respuestas de proliferación o supervivencia de monocitos humanos primarios

50 Los anticuerpos humanizados 0301-L0H0, 0301-L1H0 y 0311-L0H1 se probaron para determinar su capacidad para estimular directamente la proliferación y/o supervivencia de monocitos primarios, del siguiente modo.

Se aislaron monocitos de sangre periférica humana como se describe en el Ejemplo 10. Se añadieron diluciones en serie del anticuerpo humanizado 0301-L0H0, del anticuerpo humanizado 0301-L1H0 o del anticuerpo humanizado 0311-L0H1 a los monocitos en ausencia de estimulación, ya sea por CSF1 exógeno o por IL34 exógena. Después de

incubación a 37 °C durante 48 horas, el contenido de ATP celular relativo de cada cultivo individual se evaluó utilizando el reactivo CellTiterGlo® (Promega) como en el Ejemplo 10. El experimento se llevó a cabo en monocitos de sangre periférica de tres donantes diferentes.

- 5 Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 12. Ninguno de los anticuerpos humanizados estimuló la proliferación o supervivencia de monocitos primarios en ninguna de las preparaciones de monocitos primarios analizadas.

TABLA DE SECUENCIAS

- 10 La Tabla 8 proporciona ciertas secuencias analizadas en el presente documento. Todas las secuencias de polipéptidos y anticuerpos se muestran sin secuencias líder, a menos que se indique otra cosa.

Tabla 8: Secuencias y Descripciones

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	hCSF1R de (longitud completa, sin secuencia líder)	IPVIEPSVPE LVVKPGATVT LRCVGNNGSVE WDGPPSPHWT LYS DGSSSIL STNNATFQNT GTYRCTEFGD PLGGSAAIHL YVKDPAWPWN VLAQEVVVFE DQDALLPCLL TDPVLEAGVS LVRVRGRPLM RHTNYSFSPW HGFTIHRAKF IQSQDYQCSA LMGGRKVM SI SIRLKVQKVI PGPPALTLVP AELVRIRGEA AQIVCSASSV DVNFDVFLQH NNTKLAIPQQ SDFHNNRYQK VLTLNLDQVD FQHAGNYSCV ASNVQGHST SMFFRVVESA YLNLSSSEQNL IQEVTVGEGE NLKVMVEAYP GLQGFNWYTL GPFSDHQPEP KLANATTKDT YRHTFTLSLP RLKPSEAGRY SFLARNPGGW RALTFELTLR YPPEVSVIWT FINGSGTLLC AASGYQPQNV TWLQCSGHTD RCDEAQLVQV WDDPYPEVLS QEPFHKVTVQ SLLTVETLEH NQTYECRAHN SVSGSWAFI PISAGATHP PDEFLEFTPVV VACMSIMALL LLLLLLLLYK YKQKPKYQVR WKIIESYEGN SYTFIDPTQL PYNEKWEFPR NNLQFGKTLG AGAFGKVVEA TAFGLGKEDA VLKVAVKMLK STAHADKEA LMSELKIMSH LGQHENVNL LGACTHGGPV LVITEYCCYG DLLNFLRRKA EAMLGPSLSP QDPEGVDY KNIHLEKKYV RRDSGFSSQG VDTYVEMRPV STSSNDSFSE QDLDKEDGRP LELRDLLHFS SQVAQGMFL ASKNCIHRDV AARNVLLTNG HVAKIGDFGL ARDIMNDSNY IVKGNARLPV KWMAPESIFD CVYTVQSDVW SYGILLWEIF SLGLNPYPGI LVNSKFYKLV KDGQMAQPA FAPKNIYSIM QACWALEPTH RPTFQQICSF LQEQAQEDRR ERDYTNLPSS SRSGGSGSSS SELEEESSSE HLTCCQGDIA AQPLLQPNNY QFC
2	hCSF1R de (longitud completa, + secuencia líder)	MGPGVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEV DGPPSPHWTL YSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEFGDP LGGSAAIHL VKDPAWPWNV LAQEVVVFE DQDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGRKVM S IRLKVQKVIP GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFVFLQHN NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQGHST S MFFRVVESAY LNLSSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWYTLG PFSHQPEPK LANATTKDTY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWF INGSGTLLCA ASGYQPQNV T WLQCSGHTDR CDEAQLVQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS VGSGSWAFIP ISAGATHPP DEFLEFTPVV ACMSIMALL LLLLLLLLYK KQKPKYQVRW KIIESYEGNS YTFIDPTQLP YNEKWEFPRN NLQFGKTLGA GAFGKVVEAT AFGLGKEDAV LKVAVKMLKS TAHADKEAL MSELKIMSHL GQHENVNLL GACTHGGPVL VITEYCCYGD LLNFLRRKAE AMLGPSLSPG QDPEGVDYK NIHLEKKYVR RDSGFSSQGV DTYVEMRPVS TSSNDSFSEQ DLDKEDGRPL
		ELRDLLHFS QVAQGMFLA SKNCIHRDVA ARNVLLTNGH VAKIGDFGLA R DIMNDSNYI VKGNARLPVK WMAPESIFDC VYTVQSDVWS YGILLWEIF LGLNPYPGIL VNSKFYKLVK DGYQMAQPAF APKNIYSIMQ ACWALEP PTFQQICSF LQEQAQEDRRE RDYTNLPSSS RSGGSGSSSS ELEEESSEH LTCCQGDIA QPLLQPNNYQ FC

ES 2 706 412 T3

5	hCSF1R, ECD.506	IPVIEPSVPE LVVKPGATVT LRCVGNNGSVE WDGPPSPHWT LYS DGSSSIL STNNATFQNT GTYRCTEPGD PLGGSAAIHL YVKDPAWPVN VLAQEVVVF DQDALLPCLL TDPVLEAGVS LVRVRGRPLM RHTNYSFSPW HGFTIHRAKF IQSQDYQCSA LMGGRKVM SI SIRLKVQKVI PGPPALTLVP AELVRIRGEA AQIVCSASSV DVNFDVFLQH NNTKLAIPQQ SDFHNNRYQK VLTNLNDQVD FQHAGNYSCV ASNVQGHST SMFFRVVESA YLNLSSSEQNL IQEVTVGEGL NLKVMVEAYP GLQGFNWYTL GPFSDHQPEP KLANATTKDT YRHTFTLSLP RLKPSEAGRY SFLARNPGGW RALTFELTLR YPPEVSVIWT FINGSGTLLC AASGYQPQNV TWLQCSGHTD RCDEAQLQV WDDPYPEVLS QEPFHKVTVQ SLLTVETLEH NQTYECRAHN SVGSGSWAFI PISAGAH
6	hCSF1R ECD.506-Fc	IPVIEPSVPE LVVKPGATVT LRCVGNNGSVE WDGPPSPHWT LYS DGSSSIL STNNATFQNT GTYRCTEPGD PLGGSAAIHL YVKDPAWPVN VLAQEVVVF DQDALLPCLL TDPVLEAGVS LVRVRGRPLM RHTNYSFSPW HGFTIHRAKF IQSQDYQCSA LMGGRKVM SI SIRLKVQKVI PGPPALTLVP AELVRIRGEA AQIVCSASSV DVNFDVFLQH NNTKLAIPQQ SDFHNNRYQK VLTNLNDQVD FQHAGNYSCV ASNVQGHST SMFFRVVESA YLNLSSSEQNL IQEVTVGEGL NLKVMVEAYP GLQGFNWYTL GPFSDHQPEP KLANATTKDT YRHTFTLSLP RLKPSEAGRY SFLARNPGGW RALTFELTLR YPPEVSVIWT FINGSGTLLC AASGYQPQNV TWLQCSGHTD RCDEAQLQV WDDPYPEVLS QEPFHKVTVQ SLLTVETLEH NQTYECRAHN SVGSGSWAFI PISAGAHEPK SSDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDNLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
7	cynoCSF1R ECD (con secuencia líder)	MGPVLLLLLL VVTAWHGQGI PVIEPSGPEL VVKPGETVTL RCVGNNGSVEW DGPISPHWTL YSDGPSSVLT TTNATFQNTR TYRCTEPGD LGGSAIHL VKDPAWPVN LAKEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRLRGRPLLR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QGQDYQCSAL MGRKVM SIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASNID VDFDVFLQHN TTKLAIPQRS DFHDNRYQKV LTLSLGQVDF QHAGNYSCVA SNVQGHST MFFRVVESAY LDLSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWYTLG PFSHDQPEPK LANATTKD TY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWT S INGS GTLLCA ASGYQPQNV TLQCAGHTDR CDEAQLQVW VDPHPEVLSQ EPFQKVTVQS LLTAETLEHN QTYECRAHNS VSGSWAFIP ISAGAR
8	cynoCSF1R ECD-Fc (con secuencia líder)	MGPVLLLLLL VVTAWHGQGI PVIEPSGPEL VVKPGETVTL RCVGNNGSVEW DGPISPHWTL YSDGPSSVLT TTNATFQNTR TYRCTEPGD LGGSAIHL VKDPAWPVN LAKEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRLRGRPLLR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QGQDYQCSAL MGRKVM SIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASNID VDFDVFLQHN TTKLAIPQRS DFHDNRYQKV LTLSLGQVDF QHAGNYSCVA SNVQGHST MFFRVVESAY LDLSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWYTLG PFSHDQPEPK LANATTKD TY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWT S INGS GTLLCA ASGYQPQNV TLQCAGHTDR CDEAQLQVW VDPHPEVLSQ EPFQKVTVQS LLTAETLEHN QTYECRAHNS VSGSWAFIP ISAGARGSEP KSSDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPK KDTLMISRTP EVTVCVV DVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
3	Secuencia líder de cadena ligera	METDTLLLV LLLWVPGSTG
4	Secuencia líder de cadena pesada	MAVLGLLLCL VTFPSCVLS
9	Región variable de la cadena pesada de Fab 0301	EVQLQQSGPE LVRPGASVKM SCKASGYTFT DNYMIWVKQS HGKSLEWIGD INPYNGGTF NQKFKGKATL TVEKSSSTAY MQLNSLTSED SAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQGTSTVTV SS
10	Región variable de la cadena ligera de Fab 0301	NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSD YDGDNYMNY QKPGQPPKL LIYAASNLES GIPARFSGS SGTDFTLNH PVEEEDAATY YCHLSNEDLS TFGGGTKLEI K

ES 2 706 412 T3

11	Región variable de la cadena pesada de Fab 0302	EQQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFS DFNIHWVKQK PGQGLEWIGY INPYTDVTVY NEKFKGKATL TSDRSSSTAY MDLSSLTSED SAVYYCASYF DGTDFDYALDY WGQGTSITVS S
12	Región variable de la cadena ligera de Fab 0302	DVVVTQTPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD NYGLSFMNWF QQKPGQPPKL LIYTASNLES GIPARFSGGG SRTDFTLTID PVEADDAATY FCQQSKELPW TFGGGTRLEI K
13	Región variable de la cadena pesada de Fab 0311	EQQLQQSGPD LMKPGASVKM SCKASGYIFT DYNMHWVKQN QGKSLEWMGE INPNNGVVVY NQKFKGTTTL TVDKSSSTAY MDLHSLTSED SAVYYCTRAL YHSNFGWYFD SWGKGTTLTV SS
14	Región variable de la cadena ligera de Fab 0311	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVYD YDGDSHMNWY QQKPGQPPKL LIYTASNLES GIPARFSGSG SGADFTLTIH PVEEEDAATY YCQQGNEDPW TFGGGTRLEI K
15	CDR1 de cadena pesada de 0301	GYTFTDNYMI
16	CDR2 de cadena pesada de 0301	DINPYNGGTT FNQKFKG
17	CDR3 de cadena pesada de 0301	ESPYFSNLYV MDY
18	CDR1 de cadena ligera de 0301	KASQSVYDYG DNYMN
19	CDR2 de cadena ligera de 0301	AASNLES
20	CDR3 de cadena ligera de 0301	HLSNEDLST
21	CDR1 de cadena pesada de 0302	GYTFSDFNIH
22	CDR2 de cadena pesada de 0302	YINPYTDVTV YNEKFKG
23	CDR3 de cadena pesada de 0302	YFDGTFDYAL DY
24	CDR1 de cadena ligera de 0302	RASESVDNYG LSFMN
25	CDR2 de cadena ligera de 0302	TASNLES
26	CDR3 de cadena ligera de 0302	QQSKELPWT
27	CDR1 de cadena pesada de 0311	GYIFTDYNMH
28	CDR2 de cadena pesada de 0311	EINPNNGVVV YNQKFKG
29	CDR3 de cadena pesada de 0311	ALYHSNFGWY FDS
30	CDR1 de cadena ligera de 0311	KASQSVYDYG DSHMN
31	CDR2 de cadena ligera de 0311	TASNLES
32	CDR3 de cadena ligera de 0311	QQGNEDPWT
33	cadena pesada de cAb 0301	EVQLQQSGPE LVRPGASVKM SCKASGYTFT DNYMIWVKQS HGKSLEWIGD INPYNGGTTF NQKFKGKATL TVEKSSSTAY MQLNSLTSED SAVYYCARES PYFSNLYVMD YWGQTSVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNVDHK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPV VTCVVVDVSO EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVV DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

ES 2 706 412 T3

34	cadena ligera de cAb 0301	NIVLTQSPAS LIYAASNLES TFGGGKLEI QWKVDNALQS THQGLSSPVT	LAVSLGQRAT GIPARFSGSG KRTVAAPSVF GNSQESVTEQ KSFNRGEC	ISCKASQSVD SGTDFTLNIIH IFPPSDEQLK DSKDSTYSLS	YDGDNYMNYWY PVEEEDAATY SGTASVVCLL STLTLKADY	QQKPGQPPKL YCHLSNEDLS NNFYPREAKV EKKHVVYACEV
35	cadena pesada de cAb 0302	EIQLQQSGPE INPYTDVTVY DGTFDYALDY KDYFPEPVTV TYTCNVDPHKP TLMISRTPEV YRVVSVLTVL TLPPSQEEMT SDGSFFLYSR	LVKPGASVKM NEKFKGKATL WGQGTSITVS SWNSGALTSG SNTKVDKRV TCVVVDVSQE HQDWLNGKEY KNQVSLTCLV LTVDKSRWQE	SCKASGYTFS TSDRSSSTAY SASTKGPSVF VHTFPAVLQS SKYGPPCPPC DPEVQFNWYV KCKVSNKGLP KGFYPSDIAV GNVFSCSVMH	DFNIHWVKQK MDLSSLTSED PLAPCSRSTS SGLYSLSSVV PAPFELGGPS DGVEVHNAKT SSIEKTISKA EWESNGQPEN EALHNNHYTQK	PGQGLEWIGY SAVYYCASYF ESTAALGCLV TVPSSSLGTK VFLFPPKPKD KPREEQFNST KGQPREPQVY NYKTTTPVLD SLSLSLGGK
36	cadena ligera de cAb 0302	DVVVTQTPAS LIYTASNLES TFGGGTRLEI QWKVDNALQS THQGLSSPVT	LAVSLGQRAT GIPARFSGGG KRTVAAPSVF GNSQESVTEQ KSFNRGEC	ISCRASESVD SRTDFTLTID IFPPSDEQLK DSKDSTYSLS	NYGLSFMNWF PVEADDAATY SGTASVVCLL STLTLKADY	QQKPGQPPKL FCQQSKELPW NNFYPREAKV EKKHVVYACEV
37	cadena pesada de cAb 0311	EIQLQQSGPD INPNNGVVVY YHSNFGWYFD VKDYFPEPVT KTYTCNVDPHK DTLMISRTPE TYRVVSVLTV YTLPPSQEEM DSDGSFFLYS	LMKPGASVKM NQKFKGTTTL SWGKGTTLTV VSWNSGALTS PSNTKVDKRV VTCVVVDVSQ LHQDWLNGKE TKNQVSLTCL RLTVDKSRWQ	SCKASGYIFT TVDKSSSTAY SSASTKGPSV GVHTFPAVLQ ESKYGPPCPP EDPEVQFNWY YKCKVSNKGL VKGFPDIA EGNVFSCSVM	DYNMHWVKQK MDLHSLTSED FPLAPCSRST SSGLYSLSSV CPAPEFLGGP VDGVEVHNAK PSSIEKTISK EWESNGQPE HEALHNNHYTQ	QGKSLEWMGE SAVYYCTRAL SESTAALGCL VTVPSSSLGT SVFLFPPKPK TKPREEQFNS AKGQPREPQV NNYKTTTPVLD KLSLSLGGK
38	cadena ligera de cAb 0311	DIVLTQSPAS LIYTASNLES TFGGGTRLEI QWKVDNALQS THQGLSSPVT	LAVSLGQRAT GIPARFSGSG KRTVAAPSVF GNSQESVTEQ KSFNRGEC	ISCKASQSVD SGADFTLTIH IFPPSDEQLK DSKDSTYSLS	YDGDSHMNYWY PVEEEDAATY SGTASVVCLL STLTLKADY	QQKPGQPPKL YCQQGNEDPW NNFYPREAKV EKKHVVYACEV
39	región variable de cadena pesada de h0301-H0	QVQLVQSGAE INPYNGGTF PYFSNLYVMD	VKKPGSSVKV NQKFKGRVTI YWGQGLVTV	SCKASGYTFT TADKSTSTAY SS	DNYMIWVRQA MELSSLRSED	PGQGLEWMGD TAVYYCARES
40	región variable de cadena pesada de h0301-H1	QVQLVQSGAE INPYNGGTF PYFSNLYVMD	VKKPGSSVKV NQKFKGRVTI YWGQGLVTV	SCKASGYTFT TVDKSTSTAY SS	DNYMIWVRQA MELSSLRSED	PGQGLEWMGD TAVYYCARES
41	región variable de cadena pesada de h0301-H2	QVQLVQSGAE INPYNGGTF PYFSNLYVMD	VKKPGSSVKV NQKFKGRATL YWGQGLVTV	SCKASGYTFT TVDKSTSTAY SS	DNYMIWVRQA MELSSLRSED	PGQGLEWIGD TAVYYCARES
42	región variable de cadena pesada de H0302-H1	QVQLVQSGAE INPYTDVTVY DGTFDYALDY	VKKPGSSVKV NEKFKGRVTI WGQGLTVTVS	SCKASGYTFS TSDKSTSTAY S	DFNIHWVRQA MELSSLRSED	PGQGLEWMGY TAVYYCASYF
43	región variable de cadena pesada de H0302-H2	QVQLVQSGAE INPYTDVTVY DGTFDYALDY	VKKPGSSVKV NEKFKGRATL WGQGLTVTVS	SCKASGYTFS TSDKSTSTAY S	DFNIHWVRQA MELSSLRSED	PGQGLEWIGY TAVYYCASYF
44	región variable de cadena pesada de H0311-H1	QVQLVQSGAE INPNNGVVVY YHSNFGWYFD	VKKPGSSVKV NQKFKGRVTI SWGQGLVTV	SCKASGYIFT TVDKSTSTAY SS	DYNMHWVRQA MELSSLRSED	PGQGLEWMGE TAVYYCTRAL
45	región variable de cadena pesada de H0311-H2	QVQLVQSGAE INPNNGVVVY YHSNFGWYFD	VKKPGSSVKV NQKFKGTTTL SWGQGLVTV	SCKASGYIFT TVDKSTSTAY SS	DYNMHWVRQA MELSSLRSED	PGQGLEWMGE TAVYYCTRAL
46	región variable de cadena ligera de h0301-L0	EIVLTQSPAT LIYAASNLES TFGGGKVEI	LSLSPGERAT GIPARFSGSG K	LSCASQSVD SGTDFTLTIS	YDGDNYMNYWY SLEPEDFAVY	QQKPGQAPRL YCHLSNEDLS
47	región variable de cadena ligera de h0301-L1	NIVLTQSPAT LIYAASNLES TFGGGKVEI	LSLSPGERAT GIPARFSGSG K	LSCASQSVD SGTDFTLTIS	YDGDNYMNYWY SLEPEDFAVY	QQKPGQAPRL YCHLSNEDLS

ES 2 706 412 T3

48	región variable de cadena ligera de H0302-L0	EIVLTQSPAT LIYTASNLES TFGQGTKVEI	LSLSPGERAT GIPARFSGSG K	LSCRASESVD SGTDFTLTIS	NYGLSFMNWF SLEPEDFAVY	QQKPGQAPRL YCQQSKELPW
49	región variable de cadena ligera de H0302-L1	EIVLTQSPAT LIYTASNLES TFGQGTKVEI	LSLSPGERAT GIPARFSGSG K	LSCRASESVD SRTDFTLTIS	NYGLSFMNWF SLEPEDFAVY	QQKPGQAPRL YCQQSKELPW
50	región variable de cadena ligera de H0302-L2	EIVVTQSPAT LIYTASNLES TFGQGTKVEI	LSLSPGERAT GIPARFSGSG K	LSCRASESVD SRTDFTLTIS	NYGLSFMNWF SLEPEDFAVY	QQKPGQAPRL YCQQSKELPW
51	región variable de cadena ligera de H0311-L0	EIVLTQSPAT LIYTASNLES TFGQGTKVEI	LSLSPGERAT GIPARFSGSG K	LSCKASQSVD SGTDFTLTIS	YDGD SHMNWF SLEPEDFAVY	QQKPGQAPRL YCQQGNEDPW
52	región variable de cadena ligera de H0311-L1	DIVLTQSPAT LIYTASNLES TFGQGTKVEI	LSLSPGERAT GIPARFSGSG K	LSCKASQSVD SGADFTLTIS	YDGD SHMNWF SLEPEDFAVY	QQKPGQAPRL YCQQGNEDPW
53	cadena pesada de h0301-H0	QVQLVQSGAE INPYNGGTF PYFSNLYVMD VKDYFPEPVT KTYTCNVDHK DTLMISRTP TYRVVSVLTV YTLPPSQEEM DSDGSFFLYS	VKKPGSSVKV NQKFKGRVTI YWGQGT VSWNSGALTS PSNTKVDKRV VTCVVVDVSQ LHQDWLNGKE TKNQVSLTCL RLTVDKSRWQ	SCKASGYTFT TADKSTSTAY SSASTKGPSV GVHTFPAVLQ ESKYGPPCPP EDPEVQFNWY YKCKVSNKGL VKGFPYPSDIA EGNVFSCSVM	DNymiWVRQA MELSSLRSED FPLAPCSRST SSGLYSLSSV CPAPEFLGGP VDGVEVHNAK PSSIEKTISK VEWESNGQPE HEALHNHYTQ	PGQGLEWMD TAVYYCARES SESTAALGCL VTVPSSSLGT SVFLFPPKPK TKPREEQFNS AKGQPREPQV NNYKTPPVLD KSLSLSLGK
54	cadena pesada de h0301-H1	QVQLVQSGAE INPYNGGTF PYFSNLYVMD VKDYFPEPVT KTYTCNVDHK DTLMISRTP TYRVVSVLTV YTLPPSQEEM DSDGSFFLYS	VKKPGSSVKV NQKFKGRVTI YWGQGT VSWNSGALTS PSNTKVDKRV VTCVVVDVSQ LHQDWLNGKE TKNQVSLTCL RLTVDKSRWQ	SCKASGYTFT TVDKSTSTAY SSASTKGPSV GVHTFPAVLQ ESKYGPPCPP EDPEVQFNWY YKCKVSNKGL VKGFPYPSDIA EGNVFSCSVM	DNymiWVRQA MELSSLRSED FPLAPCSRST SSGLYSLSSV CPAPEFLGGP VDGVEVHNAK PSSIEKTISK VEWESNGQPE HEALHNHYTQ	PGQGLEWMD TAVYYCARES SESTAALGCL VTVPSSSLGT SVFLFPPKPK TKPREEQFNS AKGQPREPQV NNYKTPPVLD KSLSLSLGK
55	cadena pesada de h0301-H2	QVQLVQSGAE INPYNGGTF PYFSNLYVMD VKDYFPEPVT KTYTCNVDHK DTLMISRTP TYRVVSVLTV YTLPPSQEEM DSDGSFFLYS	VKKPGSSVKV NQKFKGRATL YWGQGT VSWNSGALTS PSNTKVDKRV VTCVVVDVSQ LHQDWLNGKE TKNQVSLTCL RLTVDKSRWQ	SCKASGYTFT TVDKSTSTAY SSASTKGPSV GVHTFPAVLQ ESKYGPPCPP EDPEVQFNWY YKCKVSNKGL VKGFPYPSDIA EGNVFSCSVM	DNymiWVRQA MELSSLRSED FPLAPCSRST SSGLYSLSSV CPAPEFLGGP VDGVEVHNAK PSSIEKTISK VEWESNGQPE HEALHNHYTQ	PGQGLEWMD TAVYYCARES SESTAALGCL VTVPSSSLGT SVFLFPPKPK TKPREEQFNS AKGQPREPQV NNYKTPPVLD KSLSLSLGK
56	cadena pesada de H0302-H1	QVQLVQSGAE INPYTDVTY DGTFDYALDY KDYFPEPVT TYTCNVDHK TLMISRTP YRVVSVLTV YTLPPSQEEM SDGSFFLYSR	VKKPGSSVKV NEKFKGRVTI WGQGT VSWNSGALTS SNTKVDKRV TCVVVDVSQ HQDWLNGKEY KNQVSLTCLV LTVDKSRWQE	SCKASGYTFS TSDKSTSTAY SASTKGPSVF VHTFPAVLQS SKYGPPCPP DPEVQFNWYV KCKVSNKGLP KGFYPSDIAV GNVFSCSVMH	DFNIHWVRQA MELSSLRSED PLAPCSRSTS SGLYSLSSV PAPEFLGGPS DGVEVHNAKT SSIEKTISKA EWESNGQPEN EALHNHYTQK	PGQGLEWMD TAVYYCASYF ESTAALGCLV TVPSSSLGTK VFLFPPKPKD KPREEQFNST KGQPREPQVY NYKTPPVLD SLSLSLGK
57	cadena pesada de H0302-H2	QVQLVQSGAE INPYTDVTY DGTFDYALDY KDYFPEPVT TYTCNVDHK TLMISRTP YRVVSVLTV YTLPPSQEEM SDGSFFLYSR	VKKPGSSVKV NEKFKGRATL WGQGT VSWNSGALTS SNTKVDKRV TCVVVDVSQ HQDWLNGKEY KNQVSLTCLV LTVDKSRWQE	SCKASGYTFS TSDKSTSTAY SASTKGPSVF VHTFPAVLQS SKYGPPCPP DPEVQFNWYV KCKVSNKGLP KGFYPSDIAV GNVFSCSVMH	DFNIHWVRQA MELSSLRSED PLAPCSRSTS SGLYSLSSV PAPEFLGGPS DGVEVHNAKT SSIEKTISKA EWESNGQPEN EALHNHYTQK	PGQGLEWMD TAVYYCASYF ESTAALGCLV TVPSSSLGTK VFLFPPKPKD KPREEQFNST KGQPREPQVY NYKTPPVLD SLSLSLGK

ES 2 706 412 T3

58	cadena pesada de H0311-H1	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYIFT DYNMHWVRQA PGQGLEWMGE INPNNGVVVY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTRAL YHSNFGWYFD SWGQGTLLTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT
		KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSD EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
59	cadena pesada de H0311-H2	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYIFT DYNMHWVRQA PGQGLEWMGE INPNNGVVVY NQKFKGTTTL TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTRAL YHSNFGWYFD SWGQGTLLTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT KTYTCNVDPK PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSD EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
60	cadena ligera de h0301 -L0	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
61	cadena ligera de h0301 -L1	NIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSD YDGDNYMNWY QQKPGQAPRL LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCHLSNEDLS TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
62	cadena ligera de H0302-L0	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESD NYGLSFMNWY QQKPGQAPRL LIYTASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQQSKELPW TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
63	cadena ligera de H0302-L1	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESD NYGLSFMNWY QQKPGQAPRL LIYTASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQQSKELPW TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
64	cadena ligera de H0302-L2	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESD NYGLSFMNWF QQKPGQAPRL LIYTASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQQSKELPW TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
65	cadena ligera de H0311-L0	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSD YDGDHNMWY QQKPGQAPRL LIYTASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQQGNEPWP TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
66	cadena ligera de H0311-L1	DIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQSD YDGDHNMWY QQKPGQAPRL LIYTASNLES GIPARFSGSG SGADFTLTIS SLEPEDFAVY YCQQGNEPWP TFGGGTKEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC
67	CSF1 humano	EEVSEYCSHM IGSGLHLSLQ RLIDSQMETS CQITFEFVDQ EQLKDPVCYL KKAFLLVQDI MEDTMRFRDN TPNIAIAIVQL QELSRLKSC FTKDYEBHDK ACVRTFYETP LQLEKVKNV FNETKNLLDK DWNIFSKNCN NSFACSSQG HERQSEGS
68	IL34 humana	NEPLEMWPLT QNEECTVTGF LRDKLQYRSR LQYMKHYFPI NYKISVPYEG VFRIANVTRL ORAOVSEREL RYLWVLSLSATESVODVLL EGHPSWKYLO EVQTLNLLNVQ QGLTDVEVSP KVESVLSLLN APGNLKLVR PKALLDNCFR VMELLYCSCC KQSSVLNWQD CEVPSQSCS PEPSLQYAAT QLYPPPPWSP SSPPHSTGSV RPVRAQGEGL LP

ES 2 706 412 T3

69	FR1 de aceptor A humano	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKAS
70	FR2 de aceptor A humano	WVRQAPGQGL EWMG
71	FR3 de aceptor A humano	RVTITADKST STAYMELSSL RSEDTAVYYC AR
72	FR4 de aceptor A humano	WGQGTLVTVS S
73	FR1 de aceptor B humano	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKAS
74	FR2 de aceptor B humano	WVRQAPGQGL EWMG
75	FR3 de aceptor B humano	RVTITADKST STAYMELSSL RSEDTAVYYC AR
76	FR4 de aceptor B humano	WGQGTLVTVSS
77	FR1 de aceptor C humano	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKAS
78	FR2 de aceptor C humano	WVRQAPGQGL EWMG
79	FR3 de aceptor C humano	RVTITADKST STAYMELSSL RSEDTAVYYC AR
80	FR4 de aceptor C humano	WGQGTLVTVS S
81	FR1 de aceptor D humano	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC
82	FR2 de aceptor D humano	WYQQKPGQAP RLLIY
83	FR3 de aceptor D humano	GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC
84	FR4 de aceptor D humano	FGGGTKVEIK
85	FR1 de aceptor E humano	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC
86	FR2 de aceptor E humano	WYQQKPGQAP RLLIY
87	FR3 de aceptor E humano	GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC
88	FR4 de aceptor E humano	FGQGTKVEIK
89	FR1 de aceptor F humano	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC
90	FR2 de aceptor F humano	WYQQKPGQAP RLLIY
91	FR3 de aceptor F humano	GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC
92	FR4 de aceptor F humano	FGQGTKVEIK

ES 2 706 412 T3

93	mCSF1R ECD-Fc	<p>APVIEPSGPE LVVEPGETVT LRCVSNNGSVE WDGPISPYWT LDPESPGSTL TTRNATFKNT GTYRCELED PMAGSTTIHL YVKDPAHSWN LLAQEVTVVE GQEAVLPLCLI TDPALKDSVS LMREGGRQVL RKTVYFFSPW RGFIIKAKV LDSNTYVCKT MVNGRESTST GIWLKVNVRH PEPPQIKLEP SKLVIRIRGEA AQIVCSATNA EVGFNVILKR GDTKLEIPLN SDFQDNYYKK VRALSNAVD FQDAGIYSCV ASNDVGTRTA TMNFQVVESA YLNLTSEQSL LQEVSVGDSL ILTVHADAYP SIQHYNWTYL GPFEDQRKL EFITQRATYR YTFKFLNLRV KASEAGQYFL MAQNKAGWNN LTFELTLRYP PEVSVTWMPV NGSDVLFCDV SGYPQPSVTW MECRGHTDRC DEAQALQVWN DTHPEVLSQK PFDKVIQSQ LPIGTLKHNM TYFCKTHNSV GNSSQYFRAV SLGQSKQEPK SSDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSVCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK</p>
94	S241P de IgG4 humana	<p>ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK</p>
95	Igk humana	<p>RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC</p>

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el anticuerpo comprende:

- 5 (i) una cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada (HC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 15, una CDR2 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 16 y una CDR3 de HC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 17 y
 10 (ii) una cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera (LC) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de LC que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 20;

en donde el anticuerpo se une a CSF1R humano, bloquea la unión de CSF1 e IL34 a dicho CSF1R e inhibe la fosforilación de CSF1R inducida por CSF1 e IL34.

15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende:

- (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 46;
 20 (b) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 10;
 (c) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 46;
 (d) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 46;
 25 (e) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 47;
 (f) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 40 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 47; o
 30 (g) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 41 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 47.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende:

- 35 (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 60; o
 (b) una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 61.

4. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende:

- 40 (a) una cadena pesada que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 60; o
 (b) una cadena pesada que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 61.
 45

5. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 39 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 46.

50 6. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 60.

7. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 53 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 60.

55 8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

9. El anticuerpo de las reivindicaciones 1, 2, 5 u 8, en donde el anticuerpo se selecciona de un Fab, un Fv, un scFv, un Fab' y un (Fab')₂.

60 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo se selecciona de una IgA, una IgG y una IgD.

65 11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4.

12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
13. El anticuerpo de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 que comprende una mutación S241P.
- 5 14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 10 15. Una composición que comprende un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico, en donde el primer ácido nucleico comprende una primera secuencia de polinucleótidos y el segundo ácido nucleico comprende una segunda secuencia de polinucleótidos, en donde la primera secuencia de polinucleótidos y la segunda secuencia de polinucleótidos codifican una cadena pesada y una cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 15 16. Un ácido nucleico aislado que comprende una primera secuencia de polinucleótidos y una segunda secuencia de polinucleótidos, en donde la primera secuencia de polinucleótidos y la segunda secuencia de polinucleótidos codifican una cadena pesada y una cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 20 17. Una célula hospedadora que comprende la composición de la reivindicación 15 o el ácido nucleico aislado de la reivindicación 16.
- 25 18. La célula hospedadora de la reivindicación 17, en donde la célula es una célula hospedadora eucariota o una célula hospedadora de mamífero.
- 30 19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en un método de tratamiento de cáncer, de enfermedades autoinmunitarias, de afecciones inflamatorias o de pérdida ósea osteolítica.
- 35 20. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento de enfermedad autoinmunitaria según la reivindicación 19, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de esclerosis múltiple y artritis reumatoide y en donde la pérdida ósea osteolítica se selecciona de osteoporosis, pérdida ósea osteolítica inducida por metástasis y pérdida ósea inducida por artritis reumatoide.
21. El anticuerpo para su uso en un método de tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de esófago, carcinoma de células escamosas, melanoma maligno uveal, linfoma folicular, carcinoma de células renales, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cerebro, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, melanoma, astrocitoma, cáncer de estómago y adenocarcinoma pulmonar.

Ab ID	Cadenas L/H	CDRL3																				ON	FF	OFF		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
cAb0301	parental	F	T	L	N	I	H	S	S	S	L	E	E	E	D	F	A	A	T	Y	Y	C	91-84	K	K	10
Ab1	h0301-L0H0	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	91-84	K	K	91	
Ab2	h0301-L0H1	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	46	K	K	46	
Ab3	h0301-L0H2	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	46	K	K	46	
Ab4	h0301-L1H0	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	47	K	K	47	
Ab5	h0301-L1H1	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	47	K	K	47	
Ab6	h0301-L1H2	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	47	K	K	47	
cAb0302	parental	F	T	L	T	I	D	F	V	E	A	D	E	A	D	E	A	A	T	Y	F	C	85-88	K	K	12
Ab7	h0302-L0H1	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	85-88	K	K	85	
Ab8	h0302-L1H1	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	48	K	K	48	
Ab9	h0302-L2H1	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	49	K	K	49	
Ab10	h0302-L0H2	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	50	K	K	50	
Ab11	h0302-L1H2	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	48	K	K	48	
Ab12	h0302-L2H2	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	49	K	K	49	
cAb 0311	parental	F	T	L	T	I	H	F	V	E	E	E	E	D	E	A	A	T	Y	Y	C	89-92	K	K	14	
Ab13	h0311-L0H1	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	89-92	K	K	89	
Ab14	h0311-L1H1	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	51	K	K	51	
Ab15	h0311-L0H2	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	52	K	K	52	
Ab16	h0311-L1H2	F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	51	K	K	51	
		F	T	L	T	I	S	S	L	E	E	E	E	D	F	A	A	V	Y	Y	C	52	K	K	52	

FIG. 2 (continuación)

C

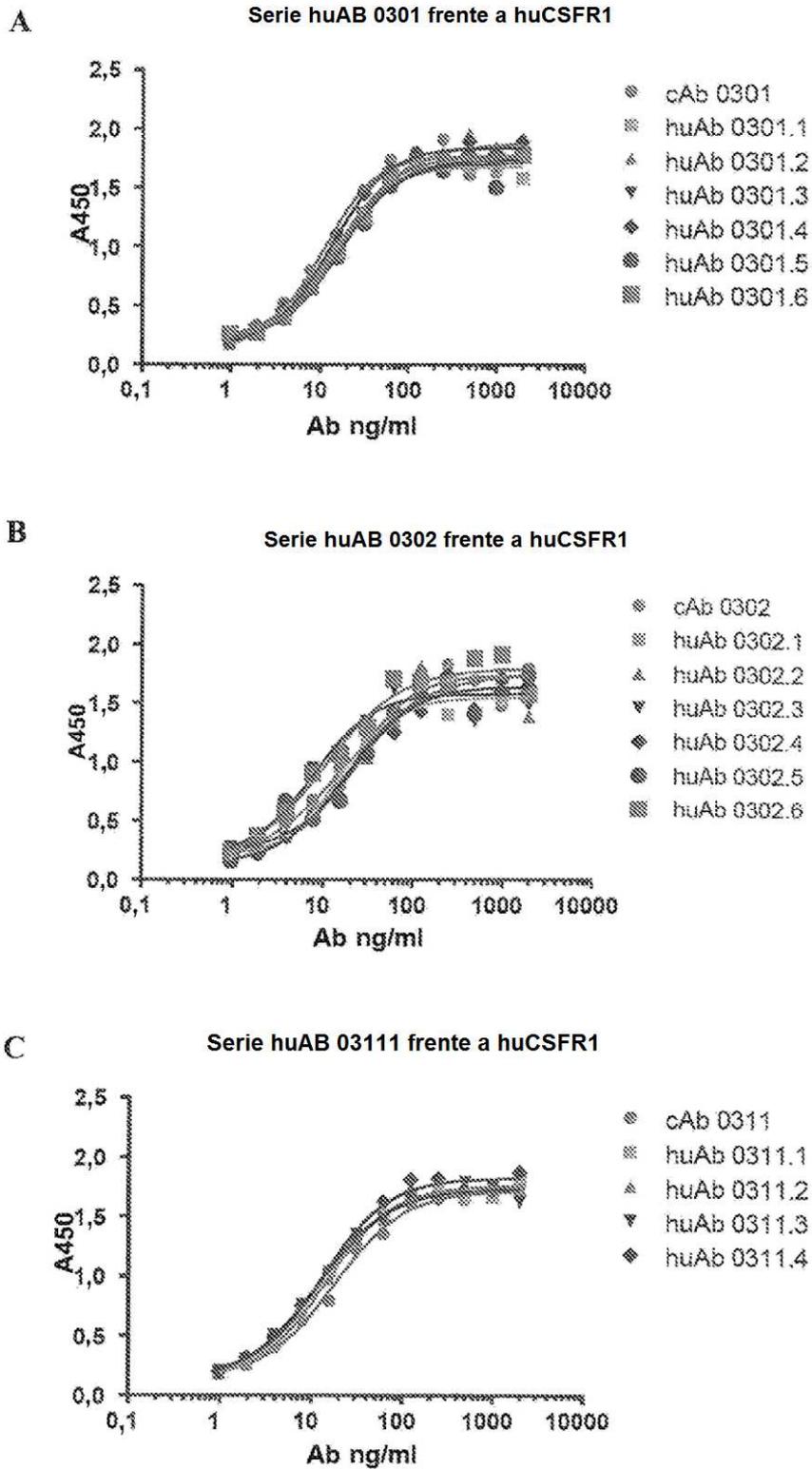


FIG. 3

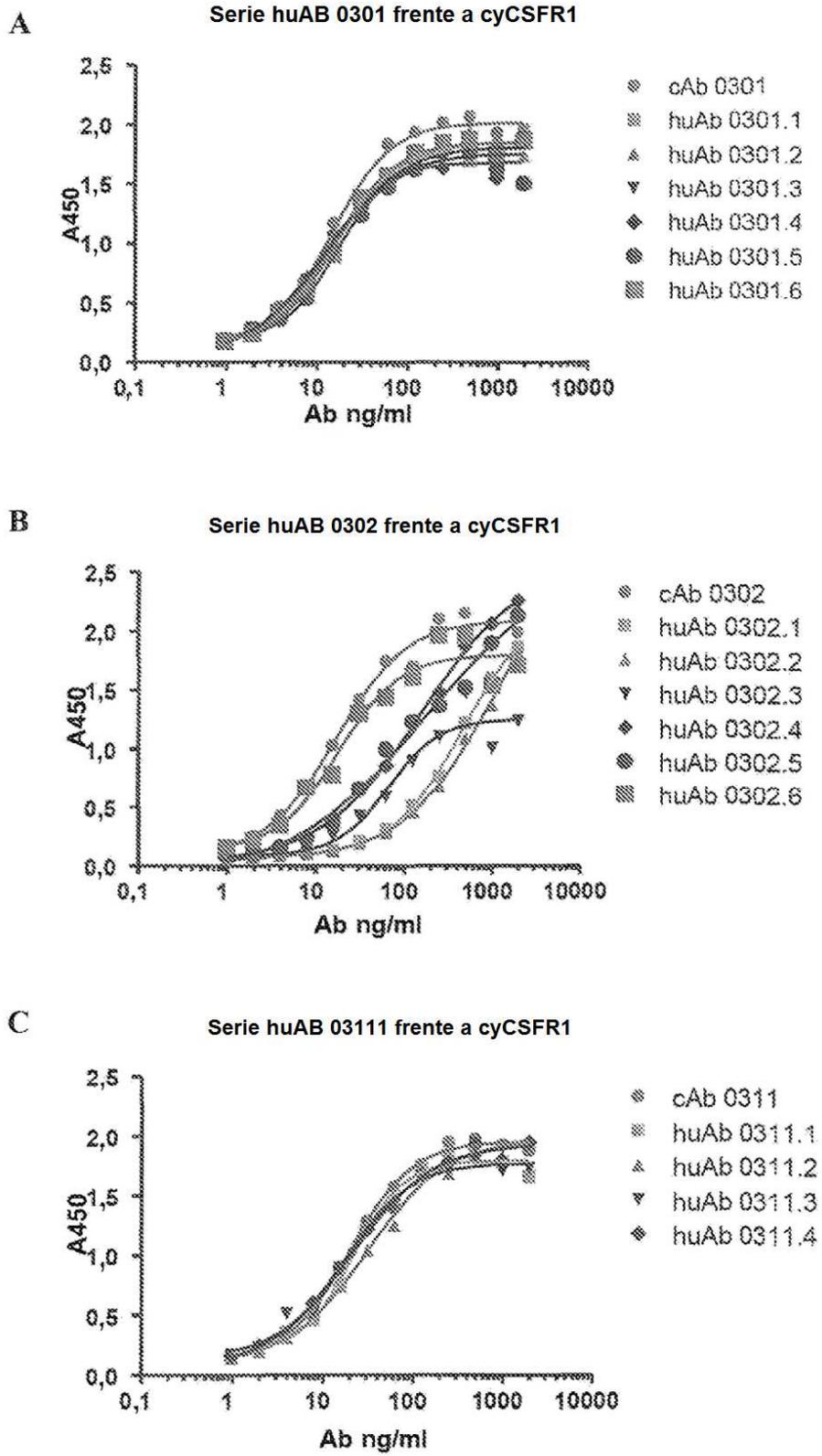


FIG. 4

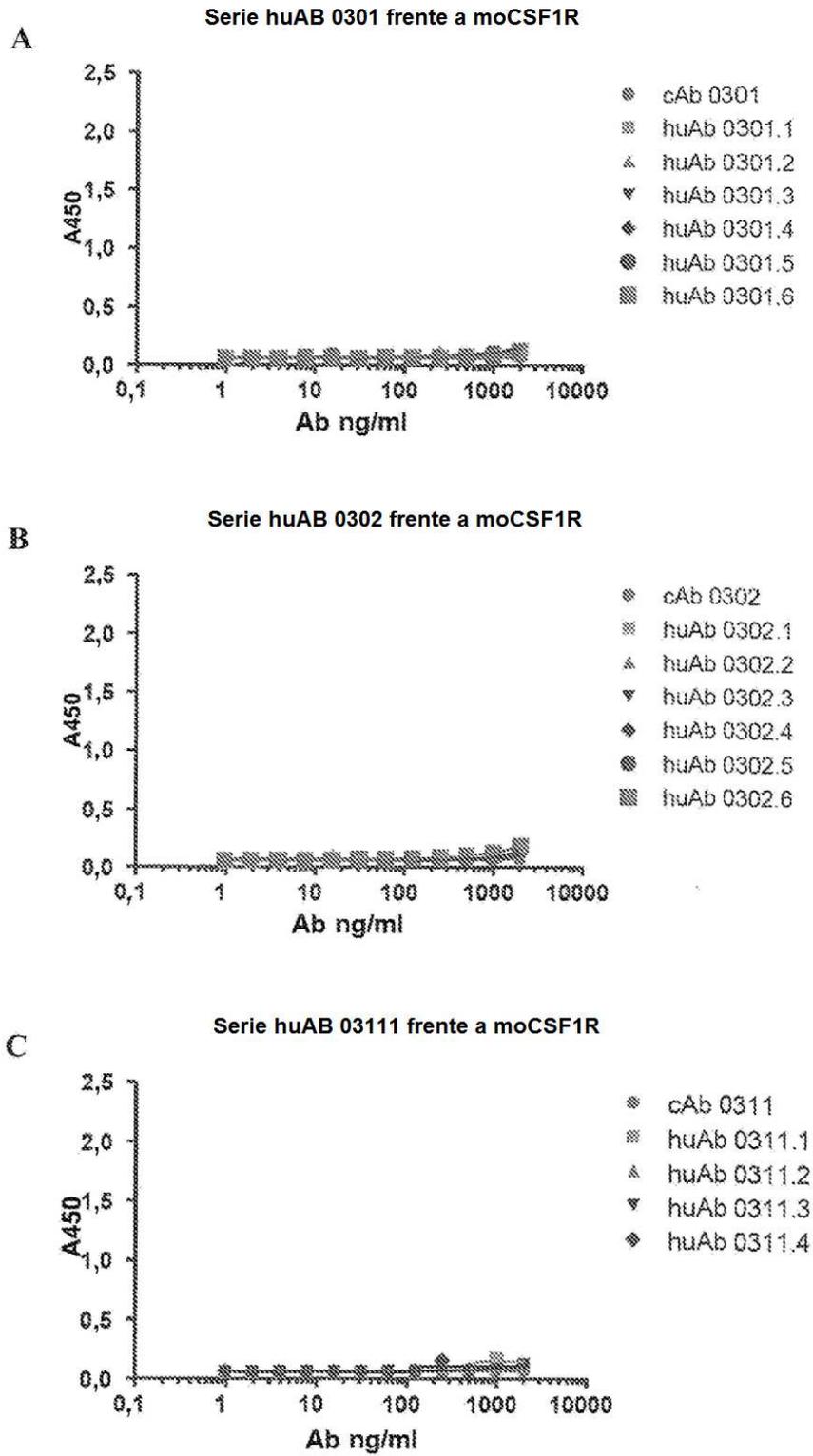


FIG. 5

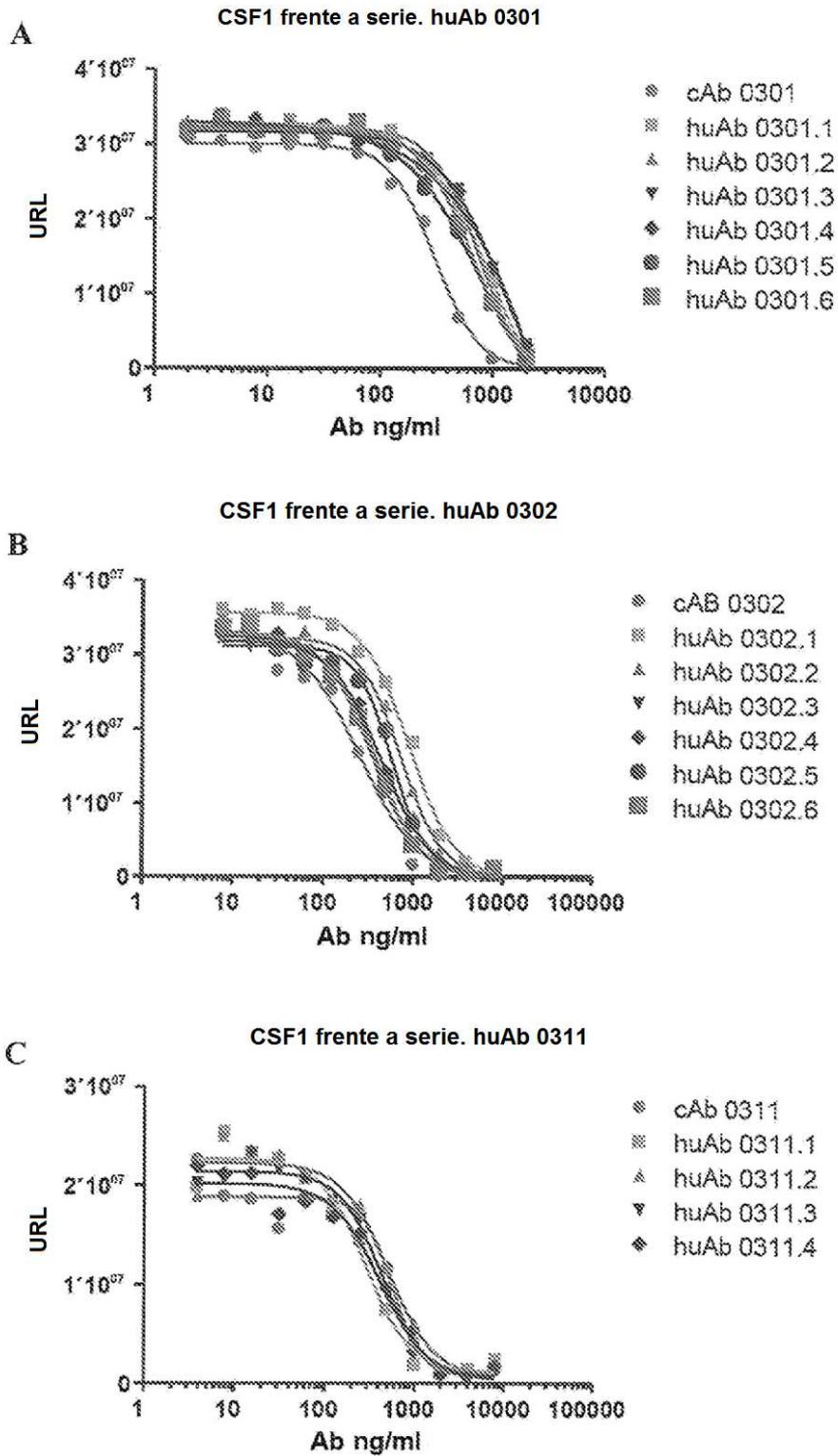


FIG. 6

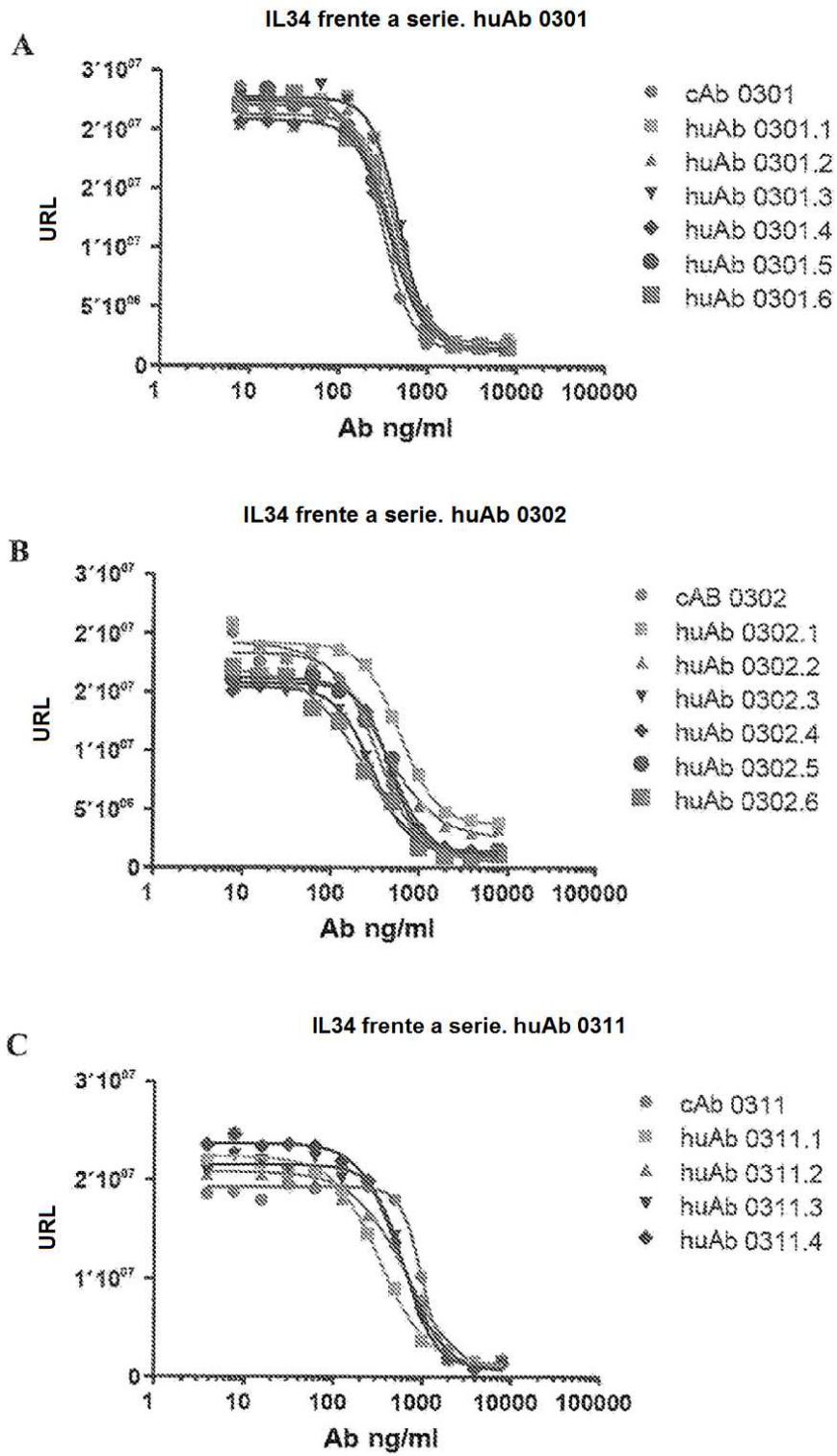


FIG. 7

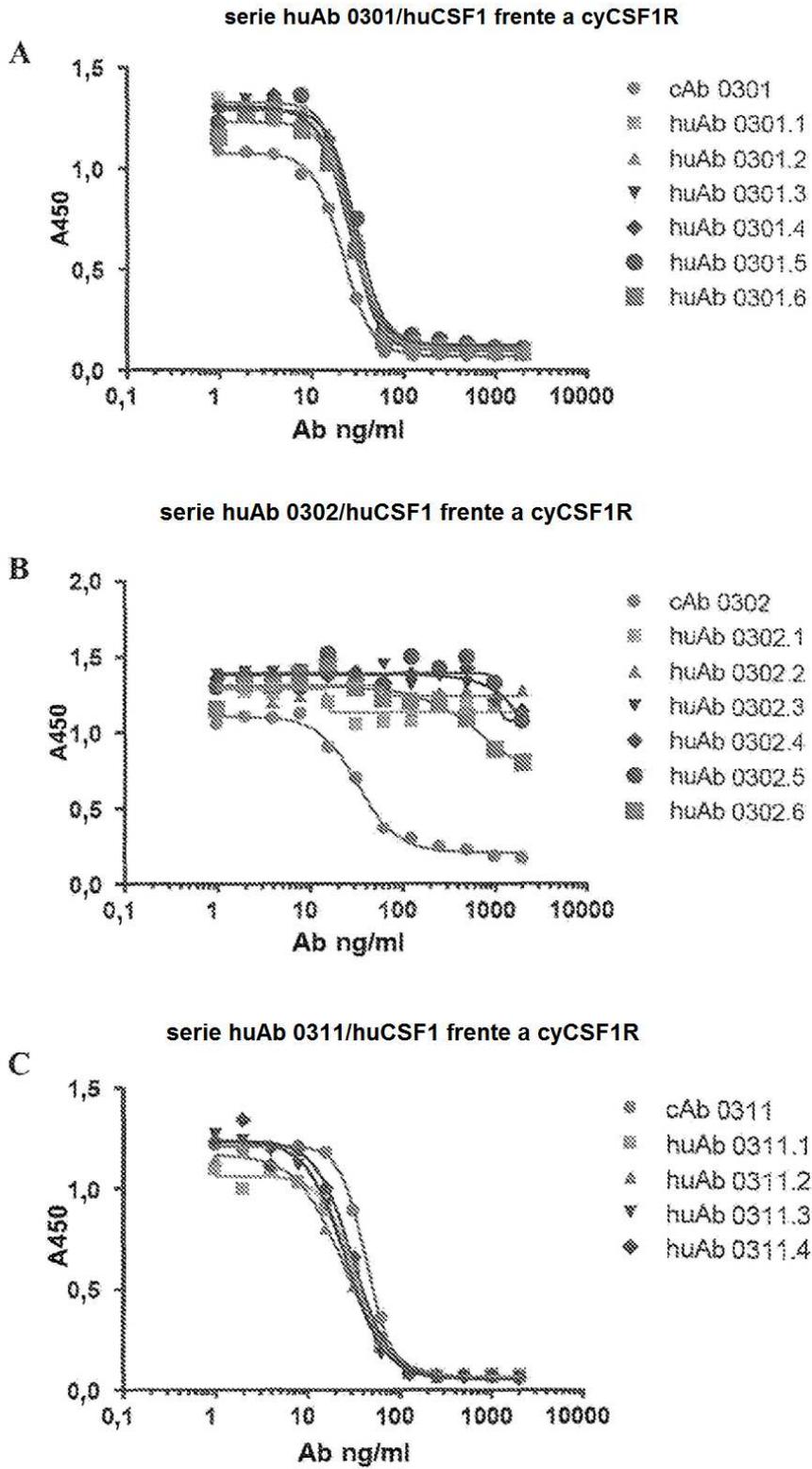


FIG. 8

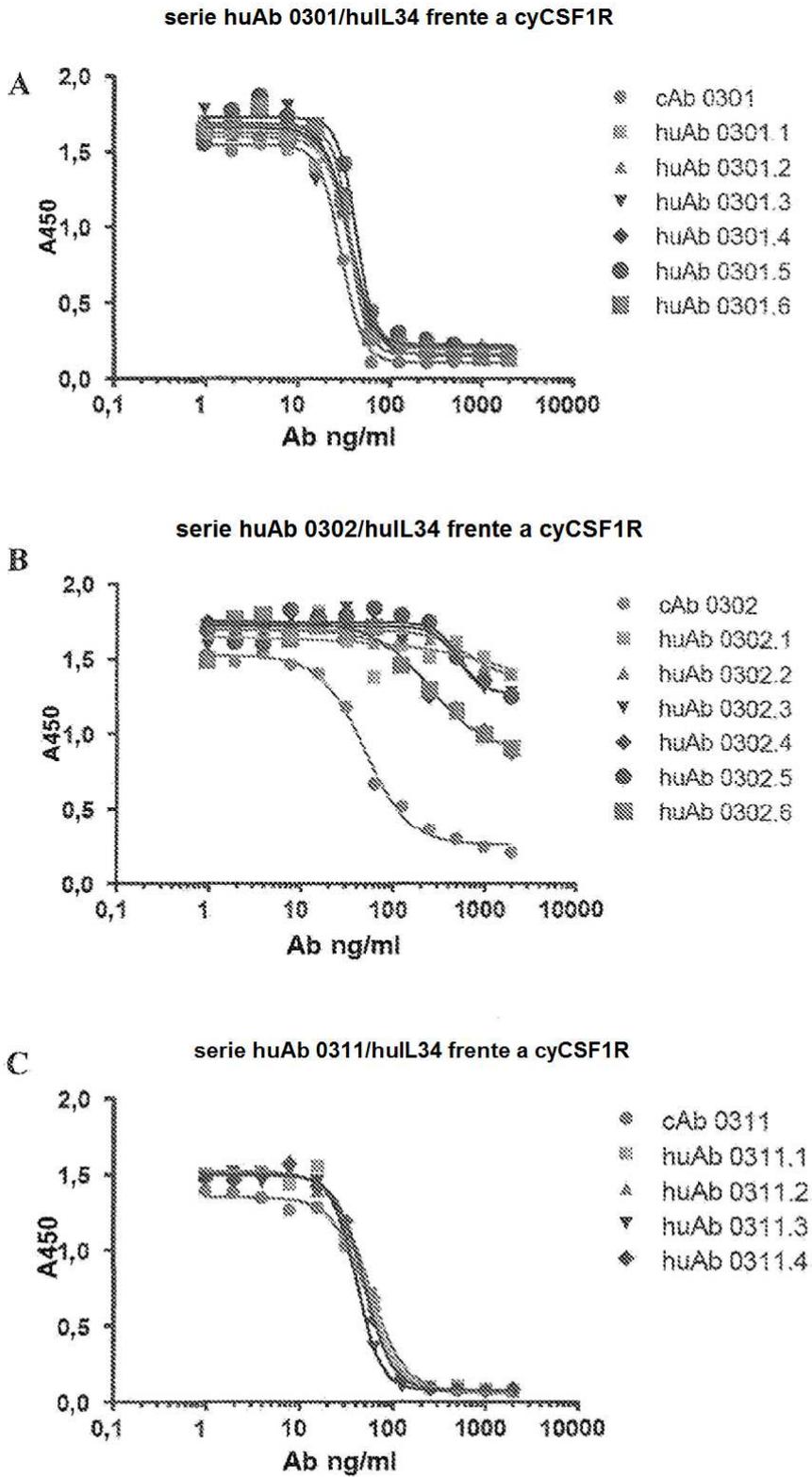


FIG. 9

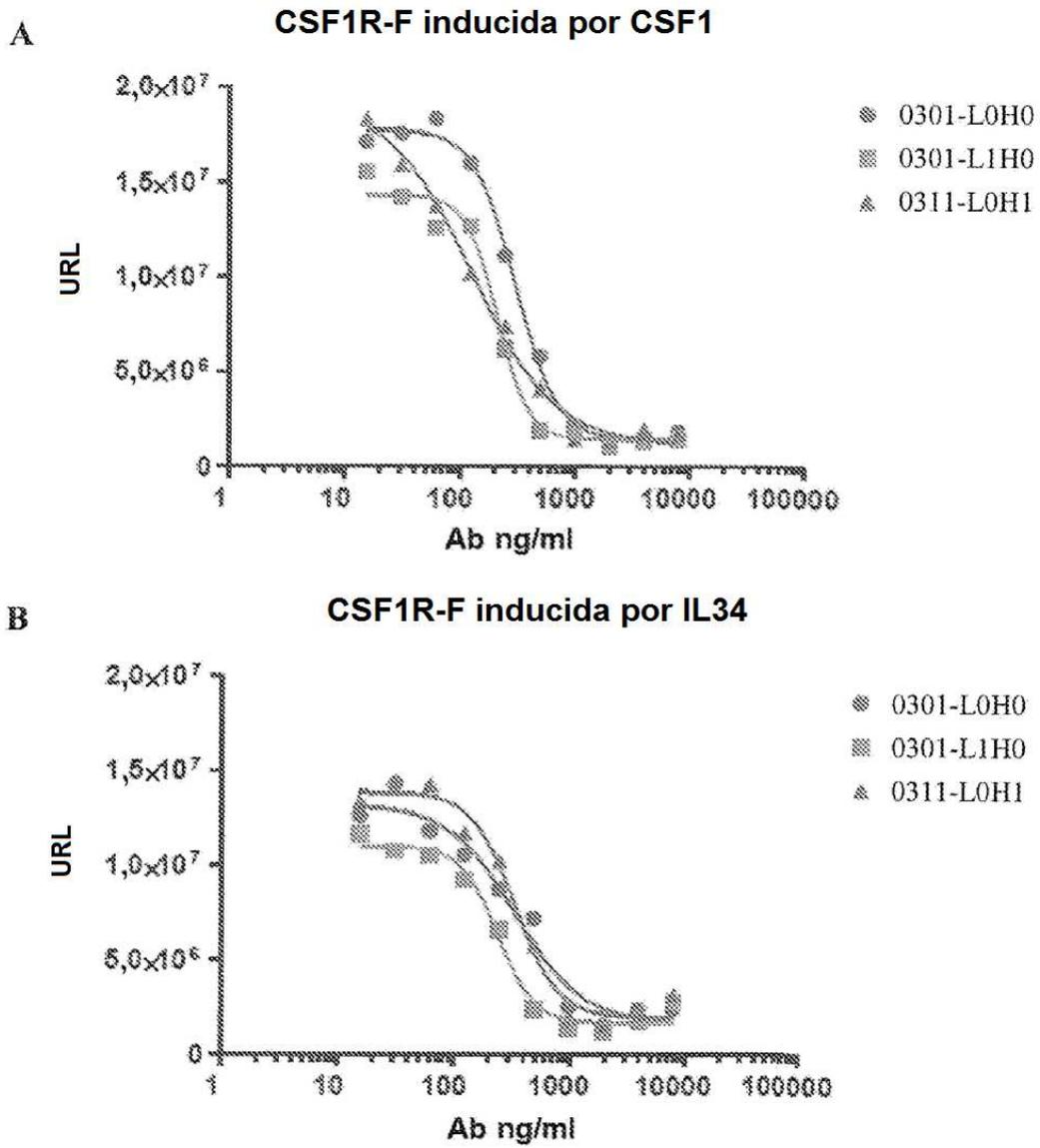


FIG. 10

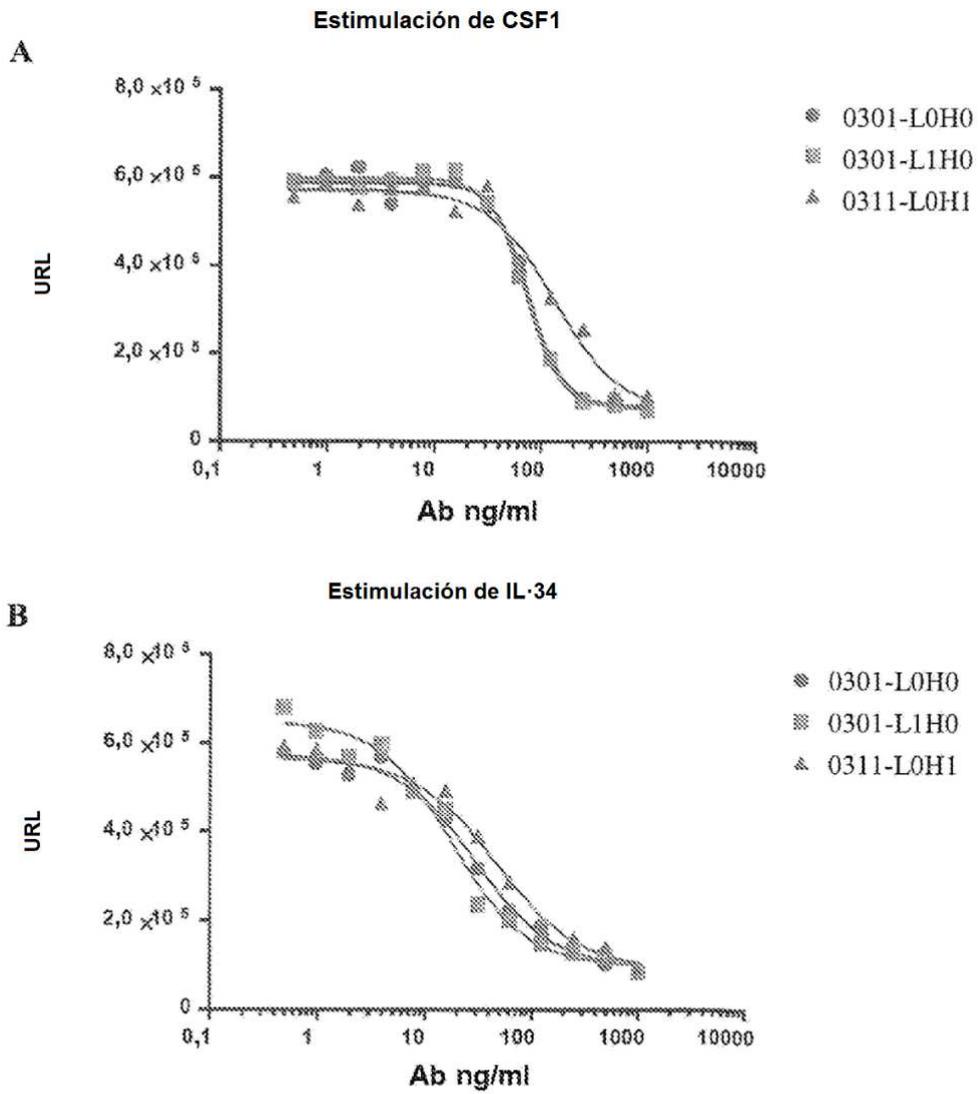


FIG. 11

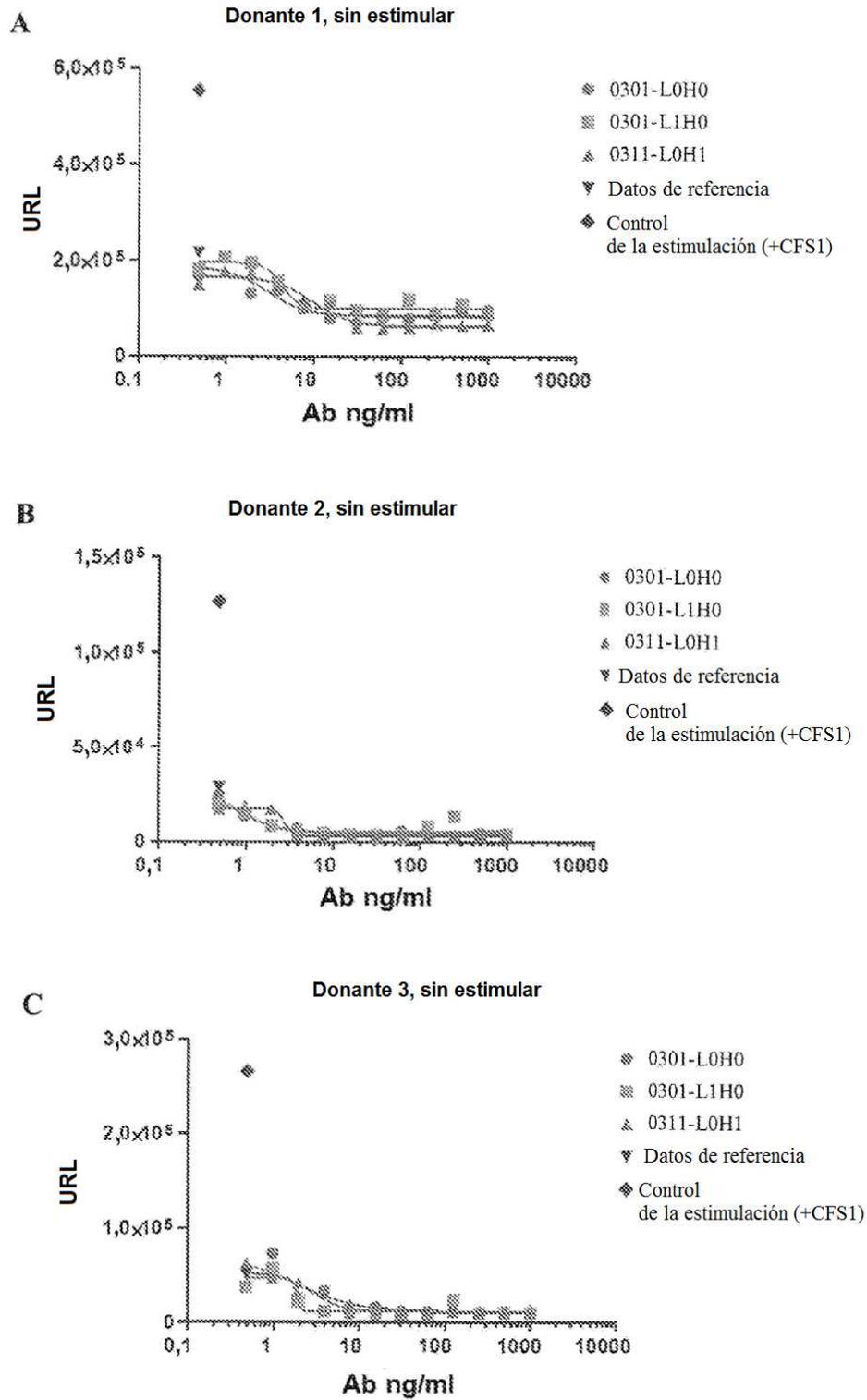


FIG. 12