

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 300**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010 E 15168902 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2949670**

54 Título: **Anticuerpos que se unen preferentemente al dominio extracelular 4 de CSF1R y su uso**

30 Prioridad:

**10.12.2009 EP 09015310**

**19.08.2010 EP 10173407**

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

**09.08.2019**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DIMOUDIS, NIKOLAOS;**

**KALUZA, KLAUS;**

**SEEBER, STEFAN;**

**FERTIG, GEORG;**

**LANZENDOERFER, MARTIN;**

**RIES, CAROLA;**

**THOMAS, MARLENE y**

**FIDLER, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones:**

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

ES 2 722 300 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 preferentemente al dominio extracelular 4 de CSF1R y su uso

5 La presente invención se refiere a anticuerpos contra los CSF-1R humano (anticuerpos anti-CSF-1R), los procedimientos para su producción, las composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y los usos de los mismos.

**Antecedentes de la invención**

10 El receptor de CSF-1 humano (CSF-1R; receptor del factor estimulante de colonias 1; sinónimos: receptor M-CSF; El receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos 1, protooncogen Fms, c-fms, SEQ ID NO: 62) es conocido desde 1986 (Coussens, L., *et al.*, Nature 320 (1986) 277-280). El CSF-1R es un factor de crecimiento y está codificado por el protooncogén c-fms (revisado, por ejemplo, en Roth, P., y Stanley, E.R., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181 (1992) 141-67).

15 El CSF-1R es el receptor para CSF-1 (factor estimulante de colonias 1, también llamado M-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos) y media los efectos biológicos de esta citocina (Sherr, C.J., *et al.*, Cell 41 (1985) 665-676). La clonación del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF-1R) (también llamado c-fms) se describió por primera vez en Roussel, M.F., *et al.*, Nature 325 (1987) 549-552. En esa publicación, se demostró que el CSF-1R tenía un potencial de transformación dependiente de los cambios en la cola C-terminal de la proteína, incluyendo la pérdida de la fosforilación de la la tirosina 969 inhibidora que se une a Cbl y, de este modo, regula la regulación por disminución del receptor (Lee, P.S., *et al.*, Embo J. 18 (1999) 3616-3628). Recientemente, se identificó un segundo ligando para CSF-1R denominado interleucina-34 (IL-34) (Lin, H., *et al.*, Science 320 (2008) 807-811).

20 La citocina CSF-1 (factor estimulante de colonias 1, también llamado M-CSF, macrófago) se encuentra extracelularmente como un homodímero con enlaces disulfuro (Stanley, E.R. *et al.*, Journal of Cellular Biochemistry 21 (1983) 151-159; Stanley, E.R. *et al.*, Stem Cells 12 Suppl. 1 (1995) 15-24).

25 Los principales efectos biológicos de la señalización de CSF-1R son la diferenciación, proliferación, migración y supervivencia de las células precursoras hematopoyéticas al linaje de macrófagos (incluyendo el osteoclasto). La activación de CSF-1R está mediada por sus ligandos, CSF-1 (M-CSF) e IF-34. La unión de CSF-1 (M-CSF) a CSF-1R induce la formación de homodímeros y la activación de la cinasa por la fosforilación de la tirosina (Li, W. *et al.*, EMBO Journal. 10 (1991) 277-288; Stanley, E.R., *et al.*, Mol. Reprod. Dev. 46 (1997) 4-10).

30 El homodímero biológicamente activo CSF-1 se une al CSF-1R dentro de los subdominios D1 a D3 del dominio extracelular del receptor de CSF-1 (CSF-1R-ECD). El CSF-1R-ECD consta de cinco subdominios de tipo inmunoglobulina (designados D1 a D5). Los subdominios D4 a D5 del dominio extracelular (CSF-1R-ECD) no están implicados en la unión del CSF-1. (Wang, Z., *et al.*, Molecular and Cellular Biology 13 (1993) 5348-5359). El subdominio D4 está implicado en la dimerización (Yeung, Y-G., *et al.*, Molecular & Cellular Proteomics 2 (2003) 1143-1155; Pixley, F. J., *et al.*, Trends Cell Biol 14 (2004) 628-638).

35 La señalización adicional está mediada por la subunidad p85 de PI3K y Grb2 que se conecta a las vías PI3K/AKT y Ras/MAPK, respectivamente. Estas dos importantes vías de señalización pueden regular la proliferación, la supervivencia y la apoptosis. Otras moléculas de señalización que se unen al dominio intracelular fosforilado de CSF-1R incluyen STAT1, STAT3, PLCy y Cbl (Bourette, R.P. y Rohrschneider, L.R., Growth Factors 17 (2000) 155-166).

40 La señalización de CSF-1R tiene un papel fisiológico en las respuestas inmunes, en la remodelación ósea y en el sistema reproductor. Los animales genomanipulados para desactivación génica de CSF-1 (Pollard, J.W., Mol. Reprod. Dev. 46 (1997) 54-61) o CSF-1R (Dai, X.M., *et al.*, Blood 99 (2002) 111-120) han demostrado tener fenotipos osteopetróticos, hematopoyéticos, de macrófagos tisulares y reproductivos consecuentes con un papel de CSF-1R en los respectivos tipos celulares.

45 Sherr, C.J., *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793 se refieren a algunos anticuerpos contra CSF-1R que inhiben la actividad de CSF-1 (véase Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793). Ashmun, R.A., *et al.*, Blood 73 (1989) 827-837 se refieren a anticuerpos contra CSF-1R. Lenda, D., *et al.*, Journal of Immunology 170 (2003) 3254-3262, se refieren a que la reducción del reclutamiento de macrófagos, la proliferación y la activación en ratones carentes de CSF-1 da como resultado una disminución de la apoptosis tubular durante la inflamación renal. Kitaura, H., *et al.*, Journal of Dental Research 87 (2008) 396-400, se refieren a un anticuerpo anti-CSF-1 que inhibe el movimiento dental ortodóntico. El documento WO 2001/030381 menciona inhibidores de la actividad de CSF-1 que incluyen nucleótidos antisentido y anticuerpos, al tiempo que divulgan solo nucleótidos antisentido de CSF-1. El documento WO 2004/045532 se refiere a metástasis y a la prevención de la disminución de la masa ósea y al tratamiento del cáncer metastásico por un antagonista de CSF-1 que se divulga solo como antagonista de anticuerpos anti-CSF-1. El documento WO 2005/046657 se refiere al tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino mediante anticuerpos anti-CSF-1. El documento US 2002/0141994 se refiere a inhibidores de factores estimulantes de colonias. El documento WO 2006/096489 se refiere al tratamiento de la artritis reumatoide mediante anticuerpos anti-CSF-1.

Los documentos WO 2009/026303 y WO 2009/112245 se refieren a determinados anticuerpos anti-CSF-1R que se unen a CSF-1R dentro de los tres primeros subdominios (D1 a D3) del dominio extracelular (CSF-1R-ECD).

**Resumen de la invención**

5 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas, y cualquier otro aspecto expuesto en el presente documento que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones es solo para fines informativos.

10 La invención comprende un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que el anticuerpo se une al fragmento del D4 del CSF-1R humano de SEQ ID NO: 65 y al dominio extracelular del CSF-1R humano de SEQ ID NO: 64.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que

15 a) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16;

b) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 75 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 76;

20 c) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 83 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 84;

o una versión humanizada del mismo.

25 La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que

el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16;

30 o una versión humanizada del mismo.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado por que

35 a) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 9, una región CDR2 de SEQ ID NO: 10 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 11, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 12, una región CDR2 de SEQ ID NO: 13 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 14, o

40 b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 69, una región CDR2 de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 71, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 72, una región CDR2 de SEQ ID NO: 73 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 74, o

45 c) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 77, una región CDR2 de SEQ ID NO: 78 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 79, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 80, una región CDR2 de SEQ ID NO: 81 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 82.

Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG4 humana.

50 Otro modo de realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención comprende además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad mediada por el CSF-1R.

55 La invención comprende además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

La invención comprende además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la disminución de la masa ósea.

60 La invención comprende además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la metástasis.

65 La invención comprende además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades inflamatorias.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de una enfermedad mediada por el CSF-1R.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento del cáncer.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de la disminución de la masa ósea.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de metástasis.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Otro modo de realización de la invención es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que

b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 9, una región CDR2 de SEQ ID NO: 10 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 11, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 12, una región CDR2 de SEQ ID NO: 13 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 14, o

b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 69, una región CDR2 de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 71, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 72, una región CDR2 de SEQ ID NO: 73 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 74, o

b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 77, una región CDR2 de SEQ ID NO: 78 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 79, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 80, una región CDR2 de SEQ ID NO: 81 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 82.

La invención proporciona además vectores de expresión que contienen ácido nucleico de acuerdo con la invención que pueden expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procarionota o eucariota, y células huésped que contienen dichos vectores para la producción recombinante de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención comprende además una célula huésped procarionota o eucariota que comprende un vector de acuerdo con la invención.

La invención comprende además un procedimiento para la producción de un anticuerpo recombinante humano o humanizado de acuerdo con la invención, caracterizado por expresar un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped procarionota o eucariota y recuperar dicho anticuerpo de dicha célula o el sobrenadante de cultivo celular. La invención comprende además el anticuerpo obtenido mediante dicho procedimiento recombinante.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran beneficios para pacientes que necesitan un tratamiento dirigido contra CSF-1R. Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran una actividad antiproliferativa eficaz contra la proliferación independiente del ligando y dependiente del ligando y, por lo tanto, son especialmente útiles en el tratamiento del cáncer y la metástasis.

La invención proporciona además un procedimiento para tratar a un paciente que padece cáncer, que comprende administrar a un paciente al que han diagnosticado una enfermedad de este tipo (y, por lo tanto, que necesita un tratamiento de este tipo) una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención. El anticuerpo se administra preferentemente en una composición farmacéutica.

Otro modo de realización de la invención es un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece cáncer caracterizado por la administración al paciente de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Sorprendentemente, se ha descubierto que, usando un fragmento del D4 del CSF-1R humano en el que se eliminó el subdominio D4 del CSF-1R-ECD humano (SEQ ID NO: 65), se podían seleccionar los nuevos anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención. Estos anticuerpos muestran propiedades valiosas como una excelente inhibición del crecimiento celular dependiente del ligando y, al mismo tiempo, una inhibición del crecimiento celular independiente del ligando de células NIH 3T3, infectadas retrovíricamente con un vector de expresión de CSF-1R natural de longitud completa (SEQ ID NO: 62) o CSF-1R L301S Y969F mutante (SEQ ID NO: 63), por lo que las células recombinantes de CSF-1R mutantes pueden formar esferoides independientes del ligando de CSF-1. Además, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la diferenciación de macrófagos de humanos y de macacos de Java (los dos), ya que inhiben la supervivencia de los monocitos de humanos y macacos de Java.

#### **Descripción detallada de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto expuesto en el presente documento

que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones se aporta solo para fines informativos.

5 En el presente documento se divulga un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que el anticuerpo se une al fragmento del D4 del CSF-1R humano (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) y al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) con una proporción de 1:50 o menor.

10 En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que comprende, como región CDR3 del dominio variable de cadena pesada, una región CDR3 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 55.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que

15 b) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16;

o una versión humanizada del mismo.

20 La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que

a) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16;

25 b) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 75 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 76;

c) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 83 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 84;

30 o una versión humanizada del mismo.

En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que

35 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 8, o una versión humanizada del mismo.

En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que

40 a) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 23 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 24, o

b) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 31 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 32, o

45 c) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 39 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 40, o

50 d) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 47 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 48, o

e) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 55 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 56.

55 En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que

a) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 23 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 24, o

60 b) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 31 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 32, o

c) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 39 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 40, o

65 d) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 47 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 48.

- 5 En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que  
el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 23 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 24, o
- En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que  
10 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 31 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 32.
- En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que  
15 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 39 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 40.
- En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que  
20 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 47 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 48.
- La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que  
25 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16, o  
una versión humanizada del mismo.
- La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que  
30 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 75 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 76;  
o una versión humanizada del mismo.
- La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención caracterizado por que  
35 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 83 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 84;  
o una versión humanizada del mismo.
- En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que
- 40 a) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 1, una región CDR2 de SEQ  
ID NO: 2 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 3, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3  
de SEQ ID NO: 4, una región CDR2 de SEQ ID NO: 5 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 6, o,
- 45 b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 9, una región CDR2 de SEQ  
ID NO: 10 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 11, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3  
de SEQ ID NO: 12, una región CDR2 de SEQ ID NO: 13 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 14, o
- 50 c) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ  
ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 19, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3  
de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO: 21 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 22, o
- d) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de SEQ  
55 ID NO: 26 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 27, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3  
de SEQ ID NO: 28, una región CDR2 de SEQ ID NO: 29 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 30, o
- e) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de SEQ  
ID NO: 34 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 35, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3  
60 de SEQ ID NO: 36, una región CDR2 de SEQ ID NO: 37 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 38, o
- f) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 41, una región CDR2 de SEQ  
ID NO: 42 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 43, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3  
de SEQ ID NO: 44, una región CDR2 de SEQ ID NO: 45 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 46, o
- 65 g) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de SEQ  
ID NO: 50 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 51, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3  
de SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de SEQ ID NO: 53 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 54.
- La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención, caracterizado por que



de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO: 21 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 22.

En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que

5 el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de SEQ ID NO: 26 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 27, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 28, una región CDR2 de SEQ ID NO: 29 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 30.

En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que

10 el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de SEQ ID NO: 34 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 35, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 36, una región CDR2 de SEQ ID NO: 37 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 38.

15 En el presente documento se divulga un anticuerpo caracterizado por que

el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 41, una región CDR2 de SEQ ID NO: 42 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 43, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 44, una región CDR2 de SEQ ID NO: 45 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 46.

20 En un modo de realización, el anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que el anticuerpo se une al fragmento del D4 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 65) y al CSF-1R-ECD humano (SEQ ID NO: 64) con una proporción de 1:50 o menor, se caracteriza además por no unirse al fragmento D1-D3 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 66).

25 El término "anticuerpo" engloba las diversas formas de anticuerpos, incluyendo, entre otros, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos con disminución de epítomos de linfocitos T y otros anticuerpos genomanipulados, siempre y cuando se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Los "fragmentos de anticuerpo" contienen una porción del anticuerpo de longitud completa, preferentemente el dominio variable del mismo, o al menos el sitio de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos scFv se han descrito por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios, que tienen las características de un dominio V<sub>H</sub> que se une a CSF-1R, a saber, que se puede ensamblar conjuntamente con un dominio V<sub>L</sub>, o de un dominio V<sub>L</sub> que se une a CSF-1R, a saber, que se puede ensamblar conjuntamente con un dominio V<sub>H</sub> para formar un sitio de unión a antígeno funcional y, de este modo, proporcionar la propiedad.

40 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", según se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos.

45 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de ratón y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara normalmente por técnicas de ADN recombinante. Son especialmente preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable de ratón y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos de ratón/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina de ratón y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" englobadas por la presente invención son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" se denominan también "anticuerpos de clase cambiada". Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica, ahora bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; el documento US 5.202.238 y el documento US 5.204.244.

55 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un modo de realización preferente, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., *et al.*, *Nature* 314 (1985) 268-270. Opcionalmente, la región marco se puede modificar por otras mutaciones. También las CDR se pueden modificar por una o más mutaciones para generar anticuerpos de acuerdo con la invención, por ejemplo, mediante mutagénesis basada en el modelado molecular como se describe por Riechmann, L., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-327 y Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033, u otros. Las CDR especialmente preferentes corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos mencionados anteriormente de los anticuerpos quiméricos. Una "versión humanizada de un anticuerpo de acuerdo con la invención" (que es, por ejemplo, de origen de ratón) se refiere a un anticuerpo, que se basa en las secuencias de anticuerpos de ratón en las que V<sub>H</sub>

y VL se humanizan mediante técnicas estándar (incluyendo el injerto de CDR y, opcionalmente, la mutagénesis subsiguiente de determinados aminoácidos en la región marco y las CDR). Preferentemente, dicha versión humanizada está quimerizada con una región constante humana (véase, por ejemplo, las secuencias SEQ ID NO: 57-61).

Otras formas de "anticuerpos humanizados" englobados por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de acuerdo con la invención, especialmente con respecto a la unión a C1q y/o la unión al receptor Fc (FcR).

En los siguientes ejemplos, los términos "Mab" o "muMab" se refieren a anticuerpos monoclonales murinos tales como Mab 2F11 o Mab 2E10, mientras que el término "hMab" se refiere a versiones monoclonales humanizadas de dichos anticuerpos murinos tales como hMab 2F11-c11, hMab 2F11-d8, hMab 2F11-e7, hMab 2F11-f12, etc.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). También se pueden producir anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de estirpe germinal humana en dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., *et al.*, *Nature* 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M., *et al.*, *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). También se pueden producir anticuerpos humanos en colecciones de presentación en fagos (Hoogenboom, H.R. y Winter, G.J. *Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole, *et al.*, y Boerner, *et al.*, están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, S.P.C., *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Como se ha mencionado ya para los anticuerpos quiméricos y humanizados de acuerdo con la invención, el término "anticuerpo humano", según se usa en el presente documento, también comprende dichos anticuerpos que se modifican en la región constante para generar las propiedades de acuerdo con la invención, en especial en lo que respecta a la unión al C1q y/o a la unión a FcR, por ejemplo, por "cambio de clase", es decir, por cambio o mutación de partes del Fc (por ejemplo, mutación de la IgG1 a la IgG4 y/o IgG1/IgG4).

Se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante", según se usa en el presente documento, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón), que es transgénico para los genes o anticuerpos de inmunoglobulina humana expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a una hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de secuencias de VH y VL de la estirpe germinal humana y están relacionadas con ellas, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la estirpe germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen, además, dichos anticuerpos que tienen "modificaciones de secuencia conservadoras", modificaciones de secuencia de nucleótidos y aminoácidos que no afectan ni alteran las características mencionadas anteriormente del anticuerpo de acuerdo con la invención. Se pueden introducir modificaciones mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones aminoacídicas conservadoras incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales  $\beta$ -ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo de aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-CSF-1R humano se puede reemplazar preferentemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales.

Las sustituciones aminoacídicas se pueden realizar por mutagénesis basada en el modelado molecular como se describe por Riechmann, L., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-327 y Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033.

El CSF-1R humano (receptor de CSF-1; sinónimos: receptor M-CSF; El receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos 1, protooncogen Fms, c-fms, SEQ ID NO: 22) es conocido desde 1986 (Coussens, L., *et al.*, *Nature* 320

(1986) 277-280). El CSF-1R es un factor de crecimiento y está codificado por el protooncogén c-fms (revisado, por ejemplo, en Roth, P., y Stanley, E.R., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181 (1992) 141-67).

El CSF-1R es el receptor para el CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos, también llamado M-CSF) y la IL-34, y media los efectos biológicos de estas citocinas (Sherr, C.J., *et al.*, *Cell* 41 (1985) 665-676 (Fin, H., *et al.*, *Science* 320 (2008) 807-811). La clonación del receptor del factor estimulante de colonias 1 (también llamado c-fms) se describió por primera vez en Roussel, M.F., *et al.*, *Nature* 325 (1987) 549-552. En esa publicación, se demostró que el CSF-1R tenía un potencial de transformación dependiente de los cambios en la cola C-terminal de la proteína, incluyendo la pérdida de la fosforilación de la tirosina 969 inhibidora que se une a Cbl y, de este modo, gestiona la regulación por disminución del receptor (Lee, P.S., *et al.*, *Embo J.* 18 (1999) 3616-3628).

El CSF-1R es una tirosina cinasa receptora (RTK) transmembranaria y monocatenaria, y un miembro de la familia de motivos de inmunoglobulina (Ig) que contiene RTK caracterizado por 5 subdominios D1-D5 de tipo Ig repetidos en el dominio extracelular (ECD) del receptor (Wang, Z., *et al.* *Molecular and Cellular Biology* 13 (1993) 5348-5359). El dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO: 64) comprende los cinco subdominios D1-D5 de tipo Ig extracelulares. El fragmento del D4 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 65) comprende los subdominios extracelulares de tipo Ig D1-D3 y D5, pero carece del subdominio D4. El fragmento D1-D3 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 66) comprende los respectivos subdominios D1-D3. Las secuencias se enumeran sin el péptido señal **MGSGPGVLLI LLVATAWHGO G** (SEQ ID NO: 67).

El dominio intracelular de la proteína tirosina cinasa está interrumpido por un único dominio de inserción que también está presente en los otros miembros relacionados de la familia de RTK de clase III que incluyen los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de crecimiento de células madre (c-Kit) y el receptor de citocinas similar a fms (FLT3). A pesar de la homología estructural entre esta familia de receptores de factores de crecimiento, tienen distintas funciones específicas para tejido.

El CSF-1R se expresa principalmente en células del linaje monocítico y en el aparato reproductor femenino y la placenta. Además, se ha informado de la expresión de CSF-1R en células de Langerhans en la piel, un subconjunto de células musculares lisas (Inaba, T., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 5693-5699), linfocitos B (Baker, A.H., *et al.*, *Oncogene* 8 (1993) 371-378) y microglia (Sawada, M., *et al.*, *Brain Res.* 509 (1990) 119-124). Es conocido que las células con CSF-1R humano mutante (SEQ ID NO: 23) proliferan independientemente de la estimulación del ligando.

Según se usa en el presente documento, "unión a CSF-1R humano" o "que se une específicamente a CSF-1R humano" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno del CSF-1R humano con una afinidad de unión de valor de KD de  $1,0 \times 10^{-8}$  mol/l o menor a 35 °C, en un modo de realización de un valor de KD de  $1,0 \times 10^{-9}$  mol/l o menor a 35 °C. La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar a 35 °C, como la técnica de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). En el ejemplo 9 se describe un procedimiento para determinar el valor xs KD de la afinidad de unión. Por tanto, un "anticuerpo que se une a CSF-1R humano", según se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno del CSF-1R humano con una afinidad de unión de KD  $1,0 \times 10^{-8}$  mol/l o menor (preferentemente  $1,0 \times 10^{-8}$  mol/l- $1,0 \times 10^{-12}$  mol/l) a 35 °C, preferentemente de un KD  $1,0 \times 10^{-9}$  mol/l o menor a 35 °C (preferentemente  $1,0 \times 10^{-9}$  mol/l- $1,0 \times 10^{-12}$  mol/l).

La "unión al fragmento del D4 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 65) y al dominio extracelular del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64)", según se usa en el presente documento, se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (ensayo de Biacore) como se describe en el ejemplo 4. El fragmento del D4 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 65) o el dominio extracelular del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64), respectivamente, se capturan en la superficie (cada uno en una superficie separada) y se añadieron los anticuerpos sometidos a prueba (cada uno en una medición separada) y se determinaron las señales de unión respectivas (unidades de respuesta (RU)). Se sustrajeron las señales de referencia (superficie en blanco). Si las señales de los anticuerpos problemas que no se unían estaban ligeramente por debajo de 0, los valores se fijaban en 0. A continuación, se determina la proporción de las señales de unión respectivas (señal de unión (RU) al fragmento del D4 del CSF-1R humano/señal de unión (RU) al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD)). Los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen una proporción de las señales de unión (RU(delD4))/RU(CSF-1R-ECD) de 1:50 o menor, preferentemente de 1:100 o menor (el extremo incluido inferior es 0 (por ejemplo, si la RU es 0, entonces la proporción es 0:50 o 0:100)).

Esto significa que dichos anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención no se unen al fragmento del D4 del CSF-1R humano (como el anticuerpo anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18-08-2004 en DSMZ) y tienen señales de unión para la unión al fragmento del D4 del CSF-1R humano en el intervalo del anticuerpo anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5, que están por debajo de 20 RU (unidades de respuesta), preferentemente por debajo de 10 RU en un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (BIAcore) como se muestra en el ejemplo 4.

La expresión "unión al fragmento D1-D3 del CSF-1R humano" se refiere a una determinación de la afinidad de unión mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (ensayo Biacore). El anticuerpo problema se captura en la superficie y se le añadió el fragmento D1-D3 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 66) y se determinaron las afinidades

de unión respectivas. El término "que no se une al fragmento D1-D3 del CSF-1R humano" indica que, en dicho ensayo, la señal detectada estaba en el área de no más de 1,2 veces la señal de fondo y, por lo tanto, no se pudo detectar una unión significativa y no se pudo determinar ninguna afinidad de unión (véase el ejemplo 10).

5 Un modo de realización de la invención es un procedimiento de cribado para seleccionar anticuerpos de acuerdo con la invención que comprende las siguientes etapas:

10 a) determinar la señal de unión (unidades de respuesta (RU)) de los anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 65) y al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO: 64) mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie (ensayo de Biacore).

b) seleccionar anticuerpos con una proporción de las señales de unión (fragmento delD4 del CSF-1R humano/dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD)) de 50:1 o menor.

15 En un modo de realización, la determinación se realiza a 25 °C.

En un modo de realización, el procedimiento de cribado comprende como otras etapas la medición de la unión de anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento D1-D3 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 66) (D1-D3) y la selección de anticuerpos que no muestran ninguna unión a dicho fragmento.

20 El término "epítopo" denota una proteína determinante del CSF-1R humano que se puede unir específicamente a un anticuerpo. Los epítopos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales glucídicas, y normalmente los epítopos tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención se une específicamente a un CSF-1R nativo y desnaturizado.

30 El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera ( $V_L$ ), dominio variable de una cadena pesada ( $V_H$ ) como se usa en el presente documento indica cada uno del par de dominios de cadena ligera y pesada que están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio contiene cuatro regiones marco (FR), cuyas secuencias están muy conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de lámina  $\beta$  y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco y forman, conjuntamente con las CDR de la otra cadena, el sitio de unión al antígeno. Las regiones CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel en particular importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y, por lo tanto, proporcionan otro objetivo de la invención.

40 El término "porción de un anticuerpo que se une al antígeno" se usa en el presente documento en referencia a los restos residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La porción de un anticuerpo que se une al antígeno contiene residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Regiones "marco" o "FR" son las regiones del dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable, como se definen en el presente documento. Por lo tanto, los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, desde el extremo N al extremo C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de cadena pesada es la región que más contribuye a la unión al antígeno y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los residuos de un "bucle hipervariable".

50 Se pretende que los términos "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico", según se usan en el presente documento, incluyan moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es un ADN bicatenario.

55 El término "aminoácido", según se usa en esta solicitud, indica los carboxi  $\alpha$ -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

60 En un modo de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención inhibe la unión del CSF-1 al CSF-1R. En un modo de realización con un  $CI_{50}$  de 200 ng/ml o menor, en un modo de realización con un  $CI_{50}$  de 50 ng/ml o menor. La  $CI_{50}$  de la inhibición de la unión del CSF-1 al CSF-1R se puede determinar como se muestra en el ejemplo 2.

65 En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la fosforilación del CSF-1R inducida por el CSF-1 (en células recombinantes NIH3T3-CSF-1R).

En un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 800 ng/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 600 ng/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 250 ng/ml o menor. La  $CI_{50}$  de la fosforilación del CSF-1R inducida por el CSF-1 se puede determinar como se muestra en el ejemplo 3.

5 En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben el crecimiento de células NIH3T3 recombinantes que expresan el CSF-1R humano (SEQ ID No: 62). En un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 10  $\mu$ g/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 5  $\mu$ g/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 2  $\mu$ g/ml o menor. En un modo de realización con una  $CI_{30}$  de 10  $\mu$ g/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{30}$  de 5  $\mu$ g/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{30}$  de 2  $\mu$ g/ml o menor. El valor de  $CI_{50}$ , el valor de  $CI_{30}$  o el % de inhibición del crecimiento se determinan como se muestra en el ejemplo 5.

15 En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben el crecimiento de células NIH3T3 recombinantes que expresan el CSF-1R L301S Y969F mutante humano (SEQ ID No: 63). En un modo de realización con un  $CI_{50}$  de 15  $\mu$ g/ml o menor, en un modo de realización con un  $CI_{50}$  de 10  $\mu$ g/ml o menor. En un modo de realización con una  $CI_{30}$  de 10  $\mu$ g/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 5  $\mu$ g/ml ng/ml o menor; en un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 2  $\mu$ g/ml o menor. El valor de  $CI_{50}$ , el valor de  $CI_{30}$  o el % de inhibición del crecimiento se determinan como se muestra en el ejemplo 5.

20 En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben el crecimiento de células tumorales BeWo (ATCC CCL-98) en un 65 % o más (a una concentración de anticuerpo de 10  $\mu$ g/ml y en comparación con la ausencia de anticuerpo). El % de inhibición del crecimiento se determina como se muestra en el ejemplo 8. Por ejemplo, Mab 2F11 muestra una inhibición del crecimiento de las células tumorales BeWo de un 70 %.

25 En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la diferenciación de macrófagos de humanos y de macacos de Java (ambos) (lo que está indicado por la inhibición de la supervivencia de los monocitos de humanos y macacos de Java como se muestra en los ejemplos 7 y 8). En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la supervivencia de monocitos de humanos con una  $CI_{50}$  de 0,15  $\mu$ g/ml o menor, en un modo de realización con una  $CI_{50}$  de 0,10  $\mu$ g/ml o menor. La inhibición de la supervivencia de los monocitos de humanos se determina como se muestra en el ejemplo 7. En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la supervivencia de los monocitos de macacos de Java en un 80 % o más, en un modo de realización en un 90 % o más (a una concentración de anticuerpos de 5  $\mu$ g/ml y en comparación con la ausencia de anticuerpos). La inhibición de la supervivencia de los monocitos de humanos se determina como se muestra en el ejemplo 8.

35 Otro modo de realización de la invención es un procedimiento para la producción de un anticuerpo contra CSF-1R caracterizado por que la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de clase IgG1 humana que une al CSF-1R humano de acuerdo con la invención dicho ácido nucleico modificado y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo se insertan en un vector de expresión, dicho vector se inserta en una célula huésped eucariota, la proteína codificada se expresa y se recupera de la célula huésped o del sobrenadante.

45 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferentemente por medios recombinantes. Por lo tanto, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo monoclonal aislado. Dichos procedimientos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el subsiguiente aislamiento del polipéptido del anticuerpo y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de los mismos se insertan en vectores de expresión mediante procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis).

50 La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

60 Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se realiza para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase Ausubel, F., *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

65 La expresión en células NS0 se describe, por ejemplo, por Barnes, L.M., *et al.*, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por

Durocher, Y., *et al.*, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., *et al.*, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK 293) se describe por Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.-J., en J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

El ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando está situado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está enlazado de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si está situado de manera que facilite la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, que son contiguas y están en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante ligado en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, entonces se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Los anticuerpos monoclonales se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefrosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y el ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dichos ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que se transfectan a continuación en células huésped tales como células de HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Según se usan en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" son intercambiables y todas esas designaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula del sujeto primario y cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica para la que se ha realizado el cribado en la célula transformada inicialmente.

La "parte Fc" de un anticuerpo no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presenta diversas funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por los expertos en la técnica y se define sobre la base de la escisión de anticuerpos con papaína. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ ,  $\lambda$  respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo está directamente implicada en la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) basada en la activación del complemento, la unión a C1q y la unión al receptor Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpos IgG. Mientras que la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento depende de determinadas condiciones, la unión a C1q está causada por los sitios de unión definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, por Boackle, R.J., *et al.*, Nature 282 (1979) 742-743, Lukas, T.J., *et al.*, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse, R., y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917, Burton, D.R., *et al.*, Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen, J.E., *et al.*, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie, E.E., *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh, M., *et al.*, J. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324, el documento EP 0307434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat, E.A., véase a continuación). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran activación del complemento y unión a C1q y C3, mientras que la IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q ni C3.

En un modo de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una parte Fc derivada de origen humano y preferentemente todas las otras partes de las regiones constantes humanas. Según se usa en el presente documento, el término "parte Fc derivada de origen humano" indica una parte Fc que es una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferentemente una parte Fc de la subclase IgG1 humana, una parte Fc mutada de la subclase IgG1 humana (preferentemente con una mutación en L234A + F235A), una parte Fc de la subclase IgG4 humana o una parte Fc mutada de la subclase IgG4 humana (preferentemente con una mutación

en S228P). Las más preferentes son las regiones constantes de cadena pesada humana de SEQ ID NO: 58 (subclase IgG1 humana), SEQ ID NO: 59 (subclase IgG1 humana con mutaciones L234A y L235A), SEQ ID NO: 60 de la subclase IgG4 humana) o SEQ ID NO: 61 (subclase IgG4 humana con mutación S228P).

5 Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG4 humana. En un modo de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG1 humana. En un modo de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG4 humana.

10 En un modo de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza por que las cadenas constantes son de origen humano. Dichas cadenas constantes son bien conocidas en el estado de la técnica y, por ejemplo, se describen por Kabat, E.A. (véase, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58. Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de SEQ ID NO: 57.

15 Otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

b) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16;

20 o una versión humanizada del mismo.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

25 c) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 75 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 76;

30 d) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 83 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 84;

o una versión humanizada del mismo.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

35 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16, o una versión humanizada del mismo.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

40 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 75 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 76;

o una versión humanizada del mismo.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

45 el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 83 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 84;

o una versión humanizada del mismo.

50 Otro aspecto de la invención es un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

55 a) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 9, una región CDR2 de SEQ ID NO: 10 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 11, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 12, una región CDR2 de SEQ ID NO: 13 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 14, o

b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 69, una región CDR2 de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 71, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 72, una región CDR2 de SEQ ID NO: 73 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 74, o

60 b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 77, una región CDR2 de SEQ ID NO: 78 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 79, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 80, una región CDR2 de SEQ ID NO: 81 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 82.

65 La invención comprende un procedimiento para el tratamiento de un paciente que necesita tratamiento, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención comprende el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para tratamiento.

Un modo de realización preferente de la invención son los anticuerpos contra CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento de "enfermedades mediadas por el CSF-1R" o los anticuerpos contra CSF-1R de la presente invención para su uso en la fabricación de un medicamento en el tratamiento de "enfermedades mediadas por el CSF-1R", que se pueden describir como sigue:

Hay 3 mecanismos distintos por los cuales la señalización del CSF-1R probablemente esté implicada en el crecimiento de los tumores y la metástasis. El primero es que se ha descubierto expresión del ligando y receptor del CSF en células tumorales que se originan en el aparato reproductor femenino (mama, ovario, endometrio, cuello uterino) (Scholl, S.M., *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 86 (1994) 120-126; Kacinski, B.M., Mol. Reprod. Dev. 46 (1997) 71-74; Ngan, H.Y., *et al.*, Eur. J. Cancer 35 (1999) 1546-1550; Kirma, N., *et al.*, Cancer Res 67 (2007) 1918-1926) y la expresión se ha asociado con el crecimiento del xenoinjerto de cáncer de mama, así como con un pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de mama. Se observaron dos mutaciones puntuales en CSF-1R en aproximadamente un 10-20 % de los pacientes con leucemia mielocítica aguda, leucemia mielocítica crónica y mielodisplasia sometidos a prueba en un estudio, y se descubrió que una de las mutaciones alteraba el recambio del receptor (Ridge, S.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87 (1990) 1377-1380). Sin embargo, la incidencia de las mutaciones no se pudo confirmar en estudios posteriores (Abu-Duhier, F.M., *et al.*, Br. J. Haematol. 120 (2003) 464-470). También se descubrieron mutaciones en algunos casos de cáncer hepatocelular (Yang, D.H., *et al.*, Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 3 (2004) 86-89) y mielofibrosis idiopática (Abu-Duhier, F.M., *et al.*, Br. J. Haematol. 120 (2003) 464-470). Recientemente, en la línea celular GDM-1 derivada de un paciente con leucemia mielomonoblástica se identificó la mutación Y571D en el CSF-1R (Chase, A., *et al.*, Leukemia 23 (2009) 358-364).

La sinovitis vellonodular pigmentada (SVNP) y los tumores de células gigantes tenosinoviales (TCGT) se pueden producir como resultado de una translocación que fusiona el gen M-CSF con un gen de colágeno COL6A3 y da como resultado la sobreexpresión de M-CSF (West, R.B., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 690-695). Se sugiere que un efecto apaisado es responsable de la masa tumoral resultante que consiste en células monocíticas atraídas por células que expresan el M-CSF. Los TCGT son tumores más pequeños que se pueden extirpar con relativa facilidad de los dedos donde se producen principalmente. La SVNP es más invasiva, ya que puede reaparecer en grandes articulaciones y no es tan fácil de controlar quirúrgicamente.

El segundo mecanismo se basa en el bloqueo de la señalización a través de M-CSF/CSF-1R en localizaciones metastásicas en el hueso, que induce osteoclastogénesis, resorción ósea y lesiones óseas osteolíticas. Los cánceres de mama, mieloma múltiple y pulmón son ejemplos de cánceres de los que se ha descubierto que metastatizan al hueso y causan metástasis osteolíticas, y resultan en complicaciones óseas. El M-CSF liberado por células tumorales y estroma induce la diferenciación de progenitores de monocitos mieloides hematopoyéticos a osteoclastos maduros en colaboración con el ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL). Durante este proceso, el M-CSF actúa como un factor permisivo al dar la señal de supervivencia a los osteoclastos (Tanaka, S., *et al.*, J. Clin. Invest. 91 (1993) 257-263). Es probable que la inhibición de la actividad del CSF-1R durante la diferenciación y maduración de los osteoclastos con un anticuerpo anti-CSF-1R evite una actividad desequilibrada de los osteoclastos que provoque enfermedad osteolítica y las complicaciones óseas asociadas en la enfermedad metastásica. Mientras que el cáncer de mama, pulmón y mieloma múltiple dan típicamente como resultado lesiones osteolíticas, la metástasis ósea en el cáncer de próstata tiene inicialmente un aspecto osteoblástico en el que un aumento de la actividad de formación ósea da como resultado un "hueso reticular" que es diferente de la estructura laminar típica del hueso normal. Durante la progresión de la enfermedad, las lesiones óseas muestran un componente osteolítico significativo, así como altos niveles séricos de reabsorción ósea y sugieren que el tratamiento antirresortivo puede ser útil. Se ha demostrado que los bisfosfonatos inhiben la formación de lesiones osteolíticas y reducen el número de complicaciones óseas solo en hombres con cáncer de próstata metastásico resistente a tratamiento hormonal, pero en este punto, y hasta la fecha, su efecto sobre las lesiones osteoblásticas es controvertido y los bisfosfonatos no han sido beneficiosos para evitar la metástasis ósea o el cáncer de próstata sensible al tratamiento hormonal. El efecto de los agentes antirresortivos en el cáncer de próstata mixto osteolítico/osteoblástico todavía se está estudiando en la práctica clínica (Choueiri, M.B., *et al.*, Cancer Metastasis Rev. 25 (2006) 601-609; Vessella, R.L. y Corey, E., Clin. Cancer Res. 12 (20 Pt 2) (2006) 6285s-6290s).

El tercer mecanismo se basa en la observación reciente de que los macrófagos asociados a tumores (TAM) encontrados en tumores sólidos de cánceres de mama, próstata, ovario y cuello uterino se correlacionaron con un pronóstico desfavorable (Bingle, L., *et al.*, J. Pathol. 196 (2002) 254-265; Pollard, J.W., Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 71-78). Los macrófagos se reclutan en el tumor por el M-CSF y otras quimiocinas. A continuación, los macrófagos pueden contribuir a la progresión del tumor a través de la secreción de factores angiogénicos, proteasas y otros factores de crecimiento y citocinas, y pueden ser bloqueados por la inhibición de la señalización del CSF-1R. Recientemente, Zins *et al.* (Zins, K., *et al.*, Cancer Res. 67 (2007) 1038-1045) demostraron que la expresión del ARNip del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), el M-CSF o la combinación de ambos reducirían el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón entre un 34 % y un 50 % después de la inyección intratumoral del ARNip respectivo. El ARNip dirigido al TNF-alfa secretado por las células SW620 humanas redujo los niveles de M-CSF de ratón y dio lugar a la reducción de los macrófagos en el tumor. Además, el tratamiento de los xenoinjertos de tumores MCF7 con un fragmento de unión a antígeno dirigido contra el M-CSF dio como resultado un 40 % de inhibición del crecimiento

tumoral, revirtió la resistencia a los quimioterápicos y mejoró la supervivencia de los ratones cuando se administró en combinación con quimioterápicos (Paulus, P., *et al.*, *Cancer Res.* 66 (2006) 4349-4356).

Los TAM son solo un ejemplo de un vínculo nuevo entre la inflamación crónica y el cáncer. Existen pruebas adicionales de un vínculo entre la inflamación y el cáncer, ya que muchas enfermedades crónicas se asocian con un mayor riesgo de cáncer, los cánceres surgen en sitios de inflamación crónica, los mediadores químicos de la inflamación se encuentran en muchos cánceres; la delección de los mediadores celulares o químicos de la inflamación inhibe el desarrollo de cánceres experimentales y el uso a largo plazo de agentes antiinflamatorios reduce el riesgo de algunos cánceres. Existe un vínculo con el cáncer para una serie de afecciones inflamatorias, entre ellas: gastritis inducida por *H. pylori* para el cáncer gástrico, esquistosomiasis para el cáncer de vejiga, HHVX para el sarcoma de Kaposi, endometriosis para el cáncer de ovario y prostatitis para el cáncer de próstata (Balkwill, F., *et al.*, *Cancer Cell* 7 (2005) 211-217). Los macrófagos son células clave en la inflamación crónica y responden de manera diferente a su microambiente. Hay dos tipos de macrófagos que se consideran extremos en un continuo de estados funcionales: los macrófagos M1 están implicados en las reacciones de tipo 1. Estas reacciones implican la activación por productos microbianos y la consiguiente destrucción de microorganismos patógenos que dan como resultado intermediarios reactivos del oxígeno. En el otro extremo del extremo están los macrófagos M2 implicados en las reacciones de tipo 2 que promueven la proliferación celular, ajustan la inflamación y la inmunidad adaptativa y promueven la remodelación tisular, la angiogénesis y la reparación (Mantovani, A., *et al.*, *Trends Immunol.* 25 (2004) 677-686). La inflamación crónica que da como resultado una neoplasia establecida se asocia habitualmente con los macrófagos M2. Una citocina fundamental que media en las reacciones inflamatorias es el TNF-alfa que, fiel a su nombre, puede estimular la inmunidad antitumoral y la necrosis hemorrágica en dosis altas, pero recientemente también se ha descubierto que está expresado por las células tumorales y actúa como promotor de tumores (Zins, K., *et al.*, *Cancer Res.* 67 (2007) 1038-1045; Balkwill, F., *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 409-416). El papel específico de los macrófagos con respecto al tumor todavía se debe entender mejor, incluyendo la posible dependencia espacial y temporal de su función y la relevancia para tipos específicos de tumores.

Por tanto, un modo de realización de la invención son los anticuerpos contra el CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer. El término "cáncer", según se usa en el presente documento, puede ser, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer de pulmón bronquioloalveolar, cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma endometrial, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de partes blandas, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma hipofisario, linfoma, leucemia linfocítica, incluyendo versiones resistentes al tratamiento de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. Preferentemente, dicho cáncer es un cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón o cáncer de próstata. Preferentemente, dichos cánceres se caracterizan, además, por la expresión o sobreexpresión del CSF-1 o CSF-1R. Otro modo de realización de la invención son los anticuerpos contra el CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento simultáneo de tumores primarios y nuevas metástasis.

Por tanto, otro modo de realización de la invención son los anticuerpos contra el CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento de periodontitis, histiocitosis X, osteoporosis, enfermedad de Paget ósea (EPO), disminución de la masa ósea debida a tratamiento contra el cáncer, osteólisis periprotésica, osteoporosis inducida por glucocorticoides, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artrosis, artritis inflamatoria e inflamación.

Rabello, D., *et al.*, *Biochem. Biofis Res. Comun.* 347 (2006) 791-796 han demostrado que los SNP en el gen CSF1 presentaron una asociación positiva con la periodontitis agresiva: una enfermedad inflamatoria de los tejidos periodontales que causa pérdida de dientes debido a la reabsorción del hueso alveolar.

La histiocitosis X (también llamada histiocitosis de células de Langerhans, HCL) es una enfermedad proliferativa de las células dendríticas de Langerhans que parecen diferenciarse en osteoclastos en el hueso y lesiones de HCL óseas adicionales. Las células de Langerhans se derivan de los monocitos circulantes. Se descubrió que el aumento de los niveles de M-CSF que se han medido en sueros y lesiones se correlacionaba con la gravedad de la enfermedad (da Costa, C.E., *et al.*, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 687-693). La enfermedad se produce principalmente en una población de pacientes pediátricos y se tiene que tratar con quimioterapia cuando la enfermedad se vuelve sistémica o es recurrente.

La fisiopatología de la osteoporosis está mediada por la pérdida de osteoblastos formadores de hueso y el aumento de la reabsorción ósea dependiente de osteoclastos. Cenci *et al.* han descrito datos complementarios que muestran que una inyección de anticuerpo anti-M-CSF conserva la densidad ósea e inhibe la resorción ósea en ratones ovariectomizados (Cenci, S., *et al.*, *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 1279-1287). Recientemente se identificó un vínculo

potencial entre la disminución de la masa ósea posmenopáusica debida a la deficiencia de estrógenos y se descubrió que la presencia de linfocitos T que producen TNF afectaba el metabolismo óseo (Roggia, C., *et al.*, *Minerva Med.* 95 (2004) 125-132). Un posible mecanismo podría ser la inducción del M-CSF por el TNF-alfa *in vivo*. Un papel importante del M-CSF en la osteoclastogénesis inducida por el TNF-alfa se confirmó por el efecto de un anticuerpo dirigido contra el M-CSF que bloqueaba la osteólisis inducida por el TNF-alfa en ratones y, de este modo, creaba inhibidores de dianas potenciales de la señalización del CSF-1R para la artritis inflamatoria (Kitaura, H., *et al.*, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3418-3427).

La enfermedad de Paget ósea (EPO) es el segundo trastorno del metabolismo óseo más frecuente después de la osteoporosis, en el que las anomalías focales del aumento del recambio óseo dan lugar a complicaciones tales como dolor óseo, deformidad, fracturas patológicas y sordera. Se han identificado mutaciones en cuatro genes que regulan la función normal de los osteoclastos y predisponen a los individuos a EPO y trastornos relacionados: mutaciones por inserción en TNFRSF11A, que codifica el receptor activador del factor nuclear (NF) kappa B (RANK), un regulador crítico de la función de los osteoclastos, mutaciones inactivadoras de TNFRSF11B que codifica la osteoprotegerina (un receptor señuelo para el ligando de RANK), mutaciones del gen del sequestosoma 1 (SQSTM1), que codifica una proteína de andamiaje importante en la vía NFkappaB y mutaciones en el gen de la proteína que contiene valosina (VCP). Este gen codifica la VCP, que ejerce una función al identificar al inhibidor de NFkappaB para la degradación por el proteasoma (Daroszevska, A. y Ralston, S.H., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2 (2006) 270-277). Los inhibidores del CSF-1R dirigidos proporcionan una oportunidad para bloquear la desregulación de la señalización de RANKL indirectamente y añadir una opción de tratamiento adicional a los bisfosfonatos usados actualmente.

El tratamiento contra el cáncer inducido por la disminución de la masa ósea, especialmente en pacientes con cáncer de mama y próstata, es una indicación adicional donde un inhibidor del CSF-1R dirigido podría evitar la disminución de la masa ósea (Lester, J.E., *et al.*, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 30-35). Con el pronóstico mejorado para el cáncer de mama incipiente, las consecuencias a largo plazo de los tratamientos adyuvantes se vuelven más importantes a medida que algunos de los tratamientos, incluyendo la quimioterapia, la radioterapia, los inhibidores de la aromatasa y la ablación del ovario, afectan el metabolismo óseo al disminuir la densidad mineral ósea, lo que da como resultado un aumento del riesgo de osteoporosis y fracturas asociadas (Lester, J.E., *et al.*, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 30-35). El equivalente al tratamiento adyuvante con inhibidores de la aromatasa en el cáncer de mama es el tratamiento de ablación androgénica en el cáncer de próstata, que da lugar a la pérdida de la densidad mineral ósea y aumenta significativamente el riesgo de fracturas relacionadas con la osteoporosis (Stoch, S.A., *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 2787-2791).

Es probable que la inhibición dirigida de la señalización del CSF-1R sea beneficiosa en otras indicaciones, así como cuando tipos de células seleccionadas incluyen osteoclastos y macrófagos, por ejemplo, el tratamiento de complicaciones específicas en respuesta a la artroplastia como consecuencia de la artritis reumatoide. El fracaso del implante debido a la disminución de la masa ósea periprotésica y el consiguiente aflojamiento de las prótesis es una complicación importante de la artroplastia y requiere cirugía repetida con altas cargas socioeconómicas para el paciente individual y el sistema sanitario. Hasta la fecha, no existe ningún tratamiento farmacológico aprobado para evitar o inhibir la osteólisis periprotésica (Drees, P., *et al.*, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3 (2007) 165-171).

La osteoporosis inducida por glucocorticoides (OIGC) es otra indicación en la que un inhibidor del CSF-1R podría evitar la disminución de la masa ósea después del uso a largo plazo de glucocorticosteroides que se administran como resultado de diversas afecciones, entre ellas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y artritis reumatoide (Guzman-Clark, J.R., *et al.*, *Arthritis Rheum.* 57 (2007) 140-146; Feldstein, A.C., *et al.*, *Osteoporos. Int.* 16 (2005) 2168-2174).

La artritis reumatoide, la artritis psoriásica y la artritis inflamatoria son en sí mismas indicaciones potenciales para los inhibidores de la señalización del CSF-1R, ya que consisten en un componente de macrófagos y en un grado variable de destrucción ósea (Ritchlin, C.T., *et al.*, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 821-831). La artrosis y la artritis reumatoide son enfermedades autoinmunitarias inflamatorias causadas por la acumulación de macrófagos en el tejido conjuntivo y la infiltración de macrófagos en el líquido sinovial, que está al menos parcialmente mediada por el M-CSF. Campbell, I., K., *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 144-150, demostraron que el M-CSF se produce por células de tejido articular humano (condrocitos, fibroblastos sinoviales) *in vitro* y se encuentra en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, lo que sugiere que contribuye a la proliferación del tejido sinovial y la infiltración de macrófagos que se asocia con la patogenia de la enfermedad. Es probable que la inhibición de la señalización del CSF-1R controle el número de macrófagos en la articulación y alivie el dolor de la destrucción ósea asociada. Para minimizar los efectos adversos y para comprender mejor el impacto de la señalización del CSF-1R en estas indicaciones, un procedimiento consiste en inhibir específicamente el CSF-1R sin dirigirse a una miríada de otras cinasas, como la cinasa Raf.

Los informes recientes de la literatura correlacionan el aumento del M-CSF circulante con un pronóstico desfavorable y la progresión aterosclerótica en la arteriopatía coronaria crónica (Saitoh, T., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 35 (2000) 655-665; Ikonomidis, I., *et al.*, *Eur. Heart. J.* 26 (2005) p. 1618-1624); el M-CSF influye en el proceso aterosclerótico ayudando a la formación de macrófagos espumosos (macrófagos con LDL oxidadas ingeridas) que expresan el CSF-1R y representan la placa inicial (Murayama, T., *et al.*, *Circulation* 99 (1999) 1740-1746).

- La expresión y señalización del M-CSF y el CSF-1R se encuentra en microglía activada. La microglía, que son macrófagos residentes del sistema nervioso central, se puede activar por diversos ataques, incluyendo infecciones y lesiones traumáticas. El M-CSF se considera un regulador clave de las respuestas inflamatorias en el cerebro y los niveles de M-CSF aumentan en el VIH-1, la encefalitis, la enfermedad de Alzheimer (EA) y los tumores cerebrales. La microgliosis como consecuencia de la señalización autocrina por M-CSF/CSF-1R da como resultado la inducción de la liberación de citocinas inflamatorias y óxidos nítricos, como se demuestra, por ejemplo, mediante el uso de un modelo de daño neuronal experimental (Hao, A.J., *et al.*, *Neuroscience* 112 (2002) 889-900; Murphy, G.M., Jr., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 20967-20971). Se ha descubierto que la microglía que tiene una mayor expresión de CSF-1R rodea las placas en la EA y en el modelo de ratón transgénico de proteína precursora de amiloide V717F de la EA (Murphy, G.M., Jr., *et al.*, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 895-904). Por otra parte, los ratones op/op con menos microglia en el cerebro dieron como resultado depósito fibrilar de beta-A y pérdida neuronal en comparación con el control normal, lo que sugiere que la microglía sí tiene una función neuroprotectora en el desarrollo de la EA que falta en los ratones op/op (Kaku, M., *et al.*, *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 12 (2003) 104-108).
- La expresión y señalización del M-CSF y el CSF-1R se asocia con la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (documento WO 2005/046657). El término "enfermedad inflamatoria intestinal" se refiere a trastornos crónicos graves del tracto intestinal caracterizados por una inflamación crónica en varios sitios del tracto gastrointestinal, e incluye específicamente la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn.
- La invención comprende una unión de anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento del cáncer.
- La invención comprende una unión de anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento de la disminución de la masa ósea.
- La invención comprende una unión de anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para la prevención o el tratamiento de las metástasis.
- La invención comprende una unión de anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.
- La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado por comprender la unión del anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento del cáncer o, de forma alternativa, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.
- La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado por comprender la unión del anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento de la disminución de la masa ósea o, de forma alternativa, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la disminución de la masa ósea.
- La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado por comprender la unión del anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para la prevención o el tratamiento de metástasis o, de forma alternativa, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de metástasis.
- La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado por comprender la unión del anticuerpo al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión al epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y los fragmentos de secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.
- Otro modo de realización de la invención es un procedimiento para la producción de un anticuerpo contra CSF-1R caracterizado por que la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de clase IgG1 humana que une al CSF-1R humano de acuerdo con la invención dicho ácido nucleico modificado y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo se insertan en un vector de expresión, dicho vector se inserta en una célula huésped eucariota, la proteína codificada se expresa y se recupera de la célula huésped o del sobrenadante.

- Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferentemente por medios recombinantes. Dichos procedimientos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el subsiguiente aislamiento del polipéptido del anticuerpo y, normalmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de los mismos se insertan en vectores de expresión mediante procedimientos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o después de la lisis celular).
- La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.
- Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada, o sustancialmente pura. La purificación se realiza para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase Ausubel, F., *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).
- La expresión en células NS0 se describe, por ejemplo, por Barnes, L.M., *et al.*, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK 293) se describe por Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83, y por Schlaeger, E.-J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.
- Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CSF-1R se preparan mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, entre otros, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis con casete de una variante preparada anterior o una versión no variante del anticuerpo anti-CSF-1R humanizado.
- Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de acuerdo con la invención se combinan con secuencias de promotor, iniciación de la traducción, región constante, región 3' no traducida, poliadenilación y terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadenas pesada y ligera se pueden combinar en un solo vector, cotransfectar, transfectar en serie o transfectar por separado en células huésped que, a continuación, se fusionan para formar una única célula huésped que expresa ambas cadenas.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo monoclonal o una combinación de anticuerpos monoclonales, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, formulada conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Según se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de absorción/reabsorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para inyección o infusión.
- Una composición de la presente invención se puede administrar por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Además de agua, el vehículo puede ser, por ejemplo, una solución salina tamponada isotónica.
- Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.
- Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente

- invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente (cantidad eficaz). El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la tasas de excreción del compuesto particular que se emplea, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y los antecedentes médicos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
- 5
- 10 La invención comprende el uso de los anticuerpos de acuerdo con la invención para el tratamiento de un paciente que padece cáncer, especialmente cáncer de colon, pulmón o páncreas.
- La invención comprende también un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece dicha enfermedad.
- 15 La invención proporciona además un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y el uso del anticuerpo de acuerdo con la invención para dicho procedimiento.
- 20 La invención proporciona además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para la fabricación de un agente farmacéutico, preferentemente conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que padece cáncer.
- 25 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para la fabricación de un agente farmacéutico, preferentemente conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que padece cáncer.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y referencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención.

30 **Descripción de las secuencias**

SEQ ID NO: 1	CDR3 de cadena pesada, Mab 2F11
SEQ ID NO: 2	CDR2 de cadena pesada, Mab 2F11
SEQ ID NO: 3	CDR1 de cadena pesada, Mab 2F11
SEQ ID NO: 4	CDR3 de cadena ligera, Mab 2F11
SEQ ID NO: 5	CDR2 de cadena ligera, Mab 2F11
SEQ ID NO: 6	CDR1 de cadena ligera, Mab 2F11
SEQ ID NO: 7	dominio variable de cadena pesada, Mab 2F11
SEQ ID NO: 8	dominio variable de cadena ligera, Mab 2F11
SEQ ID NO: 9	CDR3 de cadena pesada, Mab 2E10
SEQ ID NO: 10	CDR2 de cadena pesada, Mab 2E10
SEQ ID NO: 11	CDR1 de cadena pesada, Mab 2E10
SEQ ID NO: 12	CDR3 de cadena ligera, Mab 2E10
SEQ ID NO: 13	CDR2 de cadena ligera, Mab 2E10
SEQ ID NO: 14	CDR1 de cadena ligera, Mab 2E10
SEQ ID NO: 15	dominio variable de cadena pesada, Mab 2E10
SEQ ID NO: 16	dominio variable de cadena ligera, Mab 2E10
SEQ ID NO: 17	CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 18	CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 19	CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 20	CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 21	CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 22	CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 23	dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 24	dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-c11
SEQ ID NO: 25	CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 26	CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 27	CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 28	CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 29	CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 30	CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 31	dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 32	dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-d8
SEQ ID NO: 33	CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-e7
SEQ ID NO: 34	CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-e7
SEQ ID NO: 35	CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-e7

SEQ ID NO: 36	CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-e7
SEQ ID NO: 37	CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-e7
SEQ ID NO: 38	CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-e7
SEQ ID NO: 39	dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-e7
SEQ ID NO: 40	dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-e7
SEQ ID NO: 41	CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 42	CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 43	CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 44	CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 45	CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 46	CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 47	dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 48	dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-f12
SEQ ID NO: 49	CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 50	CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 51	CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 52	CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 53	CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 54	CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 55	dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 56	dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-g1
SEQ ID NO: 57	región constante de cadena ligera kappa humana
SEQ ID NO: 58	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1
SEQ ID NO: 59	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1 mutada en L234A y L235A
SEQ ID NO: 60	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4
SEQ ID NO: 61	región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4 mutada en S228P
SEQ ID NO: 62	CSF-1R natural humano (CSF-1R natural)
SEQ ID NO: 63	CSF-1R mutante humano L301S Y969F
SEQ ID NO: 64	dominio extracelular del CSF-1R humano
SEQ ID NO: 65	fragmento delD4 del CSF-1R humano
SEQ ID NO: 66	fragmento D1-D3 del CSF-1R humano
SEQ ID NO: 67	péptido señal
SEQ ID NO: 68	Cebador
SEQ ID NO: 69	CDR3 de cadena pesada, Mab 1G10
SEQ ID NO: 70	CDR2 de cadena pesada, Mab 1G10
SEQ ID NO: 71	CDR1 de cadena pesada, Mab 1G10
SEQ ID NO: 72	CDR3 de cadena ligera, Mab 1G10
SEQ ID NO: 73	CDR2 de cadena ligera, Mab 1G10
SEQ ID NO: 74	CDR1 de cadena ligera, Mab 1G10
SEQ ID NO: 75	dominio variable de cadena pesada, Mab 1G10
SEQ ID NO: 76	dominio variable de cadena ligera, Mab 1G10
SEQ ID NO: 77	CDR3 de cadena pesada, Mab 2H7
SEQ ID NO: 78	CDR2 de cadena pesada, Mab 2H7
SEQ ID NO: 79	CDR1 de cadena pesada, Mab 2H7
SEQ ID NO: 80	CDR3 de cadena ligera, Mab 2H7
SEQ ID NO: 81	CDR2 de cadena ligera, Mab 2H7
SEQ ID NO: 82	CDR1 de cadena ligera, Mab 2H7
SEQ ID NO: 83	dominio variable de cadena pesada, Mab 2H7
SEQ ID NO: 84	dominio variable de cadena ligera, Mab 2H7

### **Descripción de las figuras**

**Figura 1** Inhibición del crecimiento de células tumorales BeWo en cultivo 3D con tratamiento con diferentes anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R a una concentración de 10 µg/ml. Eje de abscisas: unidades de luz relativa (RLU) media normalizadas por viabilidad correspondientes al contenido de ATP de las células (ensayo CellTiterGlo). Eje de ordenadas: sondas sometidas a prueba: Medio mínimo (FBS al 0,5 %), IgG1 de ratón (mIgG1, 10 µg/ml), IgG2a de ratón (mIgG2a 10 µg/ml), solo CSF-1, Mab 2F11, Mab 2E10, Mab2H7, Mab1G10 y SC 2-4A5. La inhibición más alta del crecimiento inducido por el CSF-1 se observó con los anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención.

**Figura 2a** Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): mientras que los anticuerpos Mab 3291 y sc 2-4A5 muestran claramente la unión a este fragmento delD4, los anticuerpos de acuerdo con la invención, por ejemplo, Mab 2F11 y Mab 2E10, no se unieron al fragmento delD4 del CSF-1R. El anticuerpo

- Figura 2b** anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento delD4 del CSF-1R. Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular del CSF-1R humano inmovilizado (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): todos los anticuerpos anti-CSF-1R muestran unión a CSF-1R-ECD. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 no se unió al CSF-1R-ECD.
- Figura 2c** Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-e7 humanizado no se unieron al fragmento delD4 del CSF-1R. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento delD4 del CSF-1R.
- Figura 2d** Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular del CSF-1R humano inmovilizado (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): Todos los anticuerpos anti-CSF-1R Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-e7 humanizado mostraron unión al CSF-1R-ECD. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 no se unió al CSF-1R-ECD.
- Figura 2e** Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): Todos los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 muestran unión al fragmento delD4 del CSF-1R. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento delD4 del CSF-1R.
- Figura 2f** Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular del CSF-1R humano inmovilizado (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): Todos los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 muestran unión al CSF-1R-ECD. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 no se unió al CSF-1R-ECD.
- Figura 3a-d:** Niveles de CSF-1 en macaco de Java después de la aplicación de diferentes dosis de anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la invención
- Figura 4** Eficacia *in vivo*: inhibición del crecimiento tumoral de anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención en el xenoinjerto BT20 de cáncer de mama

## Ejemplo 1

### **Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-CSF-1R**

5

#### **Procedimiento de inmunización de ratones NMRI.**

Se inmunizaron ratones NMRI con un vector de expresión pDisplay™ (Invitrogen, EE. UU.) que codifica el dominio extracelular de huCSF-1R utilizando electroporación. Cada ratón se inmunizó 4 veces con 100 µg de ADN. Cuando se descubrió que los títulos séricos de anti-huCSF-1R eran suficientes, se administró adicionalmente inmunización de refuerzo a los ratones una vez con 50 µg de una quimera procedente de la mezcla 1:1 de huCSF-1R ECD/huCSF-1R ECDhuFc en 200 µl de PBS por ruta intravenosa (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

10

#### **ELISA específico para antígenos**

15

Los títulos de anti-CSF-1R en sueros de ratones inmunizados se determinaron mediante ELISA específico para antígenos.

20

25

30

Se capturó 0,3 µg/ml de quimera huCSF-1R-huFc (dominio extracelular soluble) en una placa de estreptavidina (MaxiSorb; MicroCoat, DE, n.º de cat. 11974998/MC1099) con 0,1 mg/ml de anti-Fcγ biotinilado (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-066-098) y se le añadió peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con F(ab')<sub>2</sub> contra IgG de ratón (GE Healthcare, Reino Unido, n.º de cat. NA9310V) diluido 1/800 en PBS/Tween 20 al 0,05 %/BSA al 0,5 %. Los sueros de todas las punciones se diluyeron 1/40 en PBS/Tween 20 al 0,05 %/BSA al 0,5 % y se diluyeron en serie hasta 1/1638400. Se añadieron sueros diluidos a los pocillos. Se usó suero previo a la punción como control negativo. Se usó una serie de dilución de anticuerpo anti-CSF-1R Mab3291 de ratón contra Ig humana (R&D Systems, Reino Unido) de 500 ng/ml a 0,25 ng/ml como control positivo. Todos los componentes se incubaron juntos durante 1,5 horas, los pocillos se lavaron 6 veces con PBST (PBS/Tween 20 al 0,2 %) y los ensayos se desarrollaron con una solución recién preparada de ABTS® (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) durante 10 minutos a TA. La absorbancia se midió a 405 nm.

#### **Generación de hibridomas**

Los linfocitos de ratón se pueden aislar y fusionar con una línea celular de mieloma de ratón usando protocolos estándar basados en PEG para generar hibridomas. Los hibridomas resultantes se criban a continuación para la producción de anticuerpos específicos contra antígenos. Por ejemplo, las suspensiones de células aisladas de linfocitos derivados esplénicos de ratones inmunizados se fusionan con células de mieloma de ratón no secretoras Ag8 P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL-1580) con PEG al 50 %. Las células se colocan en placas a aproximadamente  $10^4$  en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo. Los pocillos individuales se criban a continuación mediante ELISA para detectar anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-CSF-1R humanos. Una vez se produce un crecimiento extenso de hibridomas, los hibridomas que secretan anticuerpos se vuelven a colocar en placas, se criban nuevamente y, si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R se pueden subclonar por FACS. Los subclones estables se cultivan a continuación *in vitro* para producir anticuerpos en el medio de cultivo de tejidos para la caracterización. Se podrían seleccionar anticuerpos de acuerdo con la invención usando la determinación de la unión de anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano y al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) como se describe en el ejemplo 4, así como la determinación de la inhibición del crecimiento de células NIH3T3 transfectadas con CSF-1R natural (señalización dependiente de ligando) o CSF-1R L301S Y969F mutante (señalización independiente de ligando) con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R como se describe en el ejemplo 5.

## 20 Cultivo de hibridomas

Los hibridomas muMAb generados se cultivaron en RPMI 1640 (PAN - n.º de catálogo (n.º de cat.) PO4-17500) complementado con L-glutamina 2 mM (GIBCO - n.º de cat. 35050-038), Na-Pyruvat 1 mM (GIBCO - n.º de cat. 11360-039), 1x NEAA (GIBCO - n.º de cat. 11140-035), FCS al 10 % (PAA - n.º de cat. A15-649), 1x Pen Strep (Roche - n.º de cat. 1074440), 1x Nutridoma CS (Roche - n.º de cat. 1363743), mercaptoetanol 50  $\mu$ M (GIBCO - n.º de cat. 31350-010) y 50 U/ml de IL-6 de ratón (Roche - n.º de cat. 1 444 581) a 37 °C y de CO<sub>2</sub> al 5 %. Algunos de los anticuerpos de ratón resultantes se han humanizado (por ejemplo, Mab 2F11) y se han expresado de forma recombinante.

## 30 Ejemplo 2

### Inhibición de la unión del CSF-1 al CSF-1R (ELISA)

Al configurar este ensayo para permitir en primer lugar la unión del anticuerpo anti-CSF-1R al CSF-1R-ECD seguido de la detección de un ligando no unido al receptor, se pueden someter a prueba tanto el ligando que desplaza anticuerpos como los anticuerpos anti-CSF-1R inhibidores de la dimerización. La prueba se realizó en placas de microtitulación de 384 pocillos (MicroCoat, DE, n.º de cat. 464718) a TA. Después de cada etapa de incubación, las placas se lavaron 3 veces con PBST.

Al principio, las placas se recubrieron con 0,5 mg/ml de F(ab')<sub>2</sub> de anti-Fc $\gamma$  biotinilado de cabra (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-006-170) durante 1 hora (h).

Después de esto, los pocillos se bloquearon con PBS complementado con Tween® 20 al 0,2 % y BSA al 2 % (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 0,5 h. Se inmovilizaron 75 ng/ml de quimera huCSF-1R-huFc (que forma el dominio extracelular soluble dimérico de huCSF-1R) en una placa durante 1 h. A continuación, se incubaron diluciones de los anticuerpos purificados en PBS/Tween 20 al 0,05 %/BSA al 0,5 % durante 1 h. Después de añadir una mezcla de 3 ng/ml de CSF-1 (Biomol, DE, n.º de cat. 60530), 50 ng/ml de clon de anti-CSF-1 biotinilado BAF216 (R&D Systems, Reino Unido) y de estreptavidina-HRP diluida 1:5000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, n.º de cat. 11089153001) durante 1 h, las placas se lavaron 6 veces con PBST. Se usó anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.), que inhibe la interacción ligando-receptor, como control positivo. Las placas se desarrollaron con solución de sustrato recién preparada BM blue® POD (BM blue®: 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, Roche Diagnostics GmbH, DE, n.º de cat. 11484281001) durante 30 minutos a TA. La absorbancia se midió a 370 nm. Se descubrió una disminución de la absorbancia, cuando el anticuerpo anti-CSF-1R causa una liberación de CSF-1 desde el complejo dimérico. Todos los anticuerpos anti-CSF-1R mostraron una inhibición significativa de la interacción del CSF-1 con el CSF-1R (véase la tabla 1). Como control de referencia se usó anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU., véase también Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793), que inhibe la interacción ligando-receptor.

Tabla 1:

#### Valores de CI<sub>50</sub> calculada para la inhibición de la interacción CSF-1/CSF-1R

Mab CSF-1R	CI <sub>50</sub> Inhibición CSF-1/CSF-1R [ng/ml]
Mab 2F11	19,3
Mab 2E10	20. 6
Mab 2H7	18,2

Mab CSF-1R	CI <sub>50</sub> Inhibición CSF-1/CSF-1R [ng/ml]
Mab 1G10	11,8
SC-2-4A5	35,2

### **Ejemplo 3**

#### **Inhibición de la fosforilación del CSF-1R inducida por el CSF-1 en células recombinantes NIH3T3-CSF-1R**

5 Se cultivaron  $4,5 \times 10^3$  células NIH 3T3, infectadas retroviralmente con un vector de expresión para el CSF-1R de longitud completa, en DMEM (PAA n.º de cat. E15-011), L-glutamina 2 mM (Sigma, n.º de cat. G7513, piruvato de sodio 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, FKS al 10 % (PAA, n.º de cat. A15-649) y 100 µg/ml de PenStrep (Sigma, n.º de cat. P4333 [10 mg/ml]) hasta que alcanzaron la confluencia. Después de esto, las células se lavaron con medio  
10 DMEM sin suero (PAA n.º de cat. 15-011) complementado con selenito de sodio [5 ng/ml] (Sigma, n.º de cat. S9133), transferrina [10 µg/ml] (Sigma, n.º de cat. T8158), BSA [400 µg/ml] (Roche Diagnostics GmbH, n.º de cat. 10735078), L-glutamina 4 mM (Sigma, n.º de cat. G7513), piruvato de sodio 2 mM (Gibco, n.º de cat. 11360), 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, cat: 11140-035), 2-mercaptoetanol [0,05 mM] (Merck, n.º de cat. M7522), 100 µg/ml y PenStrep (Sigma, n.º de cat. P4333) y se incubaron en 30 µl del mismo medio durante 16 horas para permitir la regulación por  
15 incremento del receptor. Se añadieron a las células 10 µl de anticuerpos anti-CSF-1R diluidos durante 1,5 h. A continuación, se estimularon las células con 10 µl de 100 ng/ml de huM-CSF-1 (Biomol n.º de cat. 60530) durante 5 min. Después de la incubación, se retiró el sobrenadante, se lavaron las células dos veces con 80 µl de PBS enfriado con hielo y se le añadió 50 µl de tampón de lisis recién preparado enfriado con hielo (NaCl 150 mM/Tris 20 mM pH 7,5/EDTA 1 mM/EGTA 1 mM/Triton X-100 al 1 % /1 comprimidos de inhibidor de la proteasa (Roche Diagnostics GmbH n.º de cat. 1 836 170) por 10 ml de tampón/10 µl/ml de cóctel inhibidor de fosfatasa 1 (Sigma n.º de cat. P-2850, 100x solución madre)/10 µl/ml de inhibidor de la proteasa 1 (Sigma n.º de cat. P-5726, 100x solución madre)/10 µl/ml de NaF 1 M). Después de 30 minutos en hielo, las placas se agitaron vigorosamente en un agitador de placas durante 3 minutos y, a continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 2200 rpm (Heraeus Megafuge 10).

25 La presencia de receptor de CSF-1 fosforilado y total en el lisado celular se analizó con Elisa. Para la detección del receptor fosforilado, se utilizó el kit de R&D Systems (n.º de cat. DYC3268-2) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para la detección del CSF-1R total, se inmovilizaron 10 µl del lisado en una placa mediante el uso del anticuerpo de captura contenido en el kit. Después de esto, se le añadió el anticuerpo anti-CSF-1R biotinilado diluido  
30 1:750 (R&D Systems) y el conjugado de estreptavidina-HRP diluido 1:1000. Después de 60 minutos, se desarrollaron las placas con una solución recién preparada ABTS® y se detectó la absorbancia. Los datos se calcularon como % de control positivo sin anticuerpo y el valor de la relación receptor fosfo/total expresado. El control negativo se definió sin la adición de M-CSF-1. Como control de referencia se usó anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU., véase también Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793), que inhibe la interacción ligando-receptor.

35

Tabla 2:

Valores de  $CI_{50}$  calculada para la inhibición de la fosforilación del receptor del CSF-1.

5

Mab CSF-1R	$CI_{50}$ CSF-1R Fosforilación [ng/ml]
Mab 2F11	219,4
Mab 2E10	752,0
Mab 2H7	703,4
Mab 1G10	56,6
SC-2-4A5	1006,6

#### **Ejemplo 4**

10 **Determinación de la unión de los anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano y al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD)**

**Preparación del dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5, hCSF-1R-ECD) de SEQ ID NO: 64:**

15 pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD (7836bp) codifica el ECD completo del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64) fusionado en el extremo C a un sitio de escisión de la proteasa PreScission, seguido de aa100-330 de IgG1 humana y un 6xHis-Tag, bajo el control del promotor del CMV. El péptido señal natural se ha modificado mediante la inserción de los aminoácidos G y S después de la primera M, para crear un sitio de restricción BamHI.

20 **Preparación del fragmento delD4 del CSF-1R humano (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5, hCSF-1R-delD4) de SEQ ID NO: 65:**

25 hCSF1R-delD4-V1-PreSc-hFc-His se clonó a partir de pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD por medio del protocolo de mutagénesis dirigida al sitio Stratagene QuikChange XL, usando delD4-for con secuencia CACCTCCATGTTCTTCCGGTACCCCCAGAGGTAAG (SEQ ID NO: 68) como cebador directo y delD4-rev con la secuencia de complemento inversa como cebador inverso. Se usó una variación del protocolo publicada en BioTechniques 26 (1999) 680 para extender ambos cebadores en reacciones separadas en tres ciclos que preceden al protocolo de Stratagene regular:

30 Se prepararon dos mezclas de reacción de 50  $\mu$ l separadas de acuerdo con el manual del fabricante, cada una de las cuales contenía 10 ng de plásmido pCMV-preS-Fc-hCSF1R-ECD como molde y 10 pM de uno de los cebadores delD4-for o delD4-rev, y 0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa Pfu como provee el kit. Se ejecutaron tres ciclos de PCR a 95 °C 30 s/55 °C 60 s/68 °C 8 min; a continuación, se combinaron 25  $\mu$ l de cada una de las dos mezclas de reacción en un nuevo tubo y se añadieron 0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa Pfu fresca. Se llevó a cabo el protocolo de PCR regular con 18  
35 ciclos de temperatura como especifica Stratagene en el manual del kit, seguido de una digestión final de 2 h con la enzima de restricción Dpn1 proporcionada con el kit. Los clones que llevaban la delección se detectaron mediante digestión con Cel II y Not I y se verificaron mediante secuenciación.

40 Se preparó la proteína mediante transfección transitoria en el sistema de células en suspensión Hek293 FreeStyle (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después de 1 semana, se filtró 500 ml de sobrenadante y se cargó en una columna de proteína A HiTrap MabSelect Xtra (GE healthcare) de 1 ml (0,2 ml/min). La columna se lavó primero con PBS, a continuación, con Tris 50 mM/NaCl 150 mM/EDTA 1 mM/pH 7,3. Se cargaron 75  $\mu$ l de PreScission Protease (GE n.º 27-0843-01) diluidos en 375  $\mu$ l del mismo tampón en la columna y la columna cerrada se incubó durante la noche a 4 °C con rodamiento. Se montó la columna sobre una columna GStrap FF de  
45 1 ml (GE healthcare) y se eluyó la proteína deseada (0,2 ml/min, fracciones de 0,2 ml). Las fracciones mezcladas se concentraron de 1,8 ml a 0,4 ml mediante ultrafiltración centrífuga por medio de un 3k Nanosep y se cromatografiaron sobre una S200 HR SEC en PBS (0,5 ml/min).

50 El fragmento delD4 del CSF-1R humano se obtuvo en dos fracciones como una molécula dimérica (mezcla 1, V = 1,5 ml; c = 0,30 mg/ml; masa aparente en SDS page 83 kDa, reducida a 62 kDa) y como monómero (mezcla 2, V = 1,4 ml; c = 0,25 mg/ml de masa aparente en SDS page 62 kDa). Se usó la forma dimérica para todos los experimentos.

55 **Determinación de la unión de anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano y al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (señales de unión como unidades de respuesta (RU)):**

Instrumento: Biacore T100 (GE Healthcare)  
 Programa informático: Control T100, Versión 2.0.1  
 Evaluación T100, Versión 2.0.2

Formato de ensayo Chip: CM5  
 Temperatura: 25 °C

Los fragmentos del CSF-1R se inmovilizaron por medio de acoplamiento de aminas. Para comparar la unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención, se inyectó una concentración del anticuerpo problema. Se usó anti-CSF-1R Mab3291 (R&D-Systems) y SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU., véase también Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793) como control de referencia, anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18-08-2004 en DSMZ) como control negativo, todos con las mismas condiciones que los anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención.

**Acoplamiento de aminas de fragmentos del CSF-1R**

Acoplamiento estándar de aminas de acuerdo con las instrucciones del fabricante: tampón de migración: PBS-T (Roche: 11 666 789 + Tween 20 al 0,05 %: 11 332 465), activación por mezcla de EDC/NHS, inyección de fragmento delD4 de CSF-1R humano (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) y dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) durante 600 segundos a un caudal de 10 µl/min; diluido en tampón de acoplamiento NaAc, pH 5,0, c = 10 µg/ml; finalmente, los grupos carboxilo activados restantes se bloquearon mediante inyección de etanolamina 1 M.

**Unión de <CSF-1R> Mab 2F11, Mab 2E10, Mab 3291 y sc2-4A5 y otros anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano y el dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) a 25 °C**

Tampón de migración: PBS-T (Roche: 11 666 789 + Tween20 al 0,05 %: 11 332 465)

Muestra de analito:

La unión se midió a un caudal de 30 µl/min mediante una inyección del analito con una concentración c = 10 nM. (para Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-c7 humanizado en el segundo experimento) Cada inyección duró 700 segundos, seguida de una fase de disociación de 180 segundos. La regeneración final se realizó después de cada ciclo usando NaOH 50 mM, tiempo de contacto 60 segundos, caudal 30 µl/min.

Las señales se midieron mediante un punto de informe 10 segundos después del final de la inyección. Las señales de referencia (señales de una cubeta de lectura de referencia en blanco (tratada con EDC/NHS y etanolamina, únicamente) se sustrajeron para dar las señales de unión (como RU). Si las señales de unión de los anticuerpos que no se unían estaban ligeramente por debajo de 0 (Mab 2F11 = -3; Mab 2E10 = -2; Mab 1G10 = -6, Mab 2H7 = -9; y hMab 2F11-e7 humanizado = -7), los valores se establecieron como 0.

**Tabla 3a:**

**Unión de <CSF-1R> MAb al fragmento delD4 del CSF-1R humano y CSF-1R-ECD y proporción a 25 °C, medida por SPR**

	Unión a delD4 [RU]	Unión a CSF-1R-ECD [RU]	Proporción de unión de anticuerpos anti-CSF1R al fragmento delD4 del CSF1R / a CSF-1R-ECD
Mab 3291	1015	627	1015/627 = 1,61
sc2-4A5	374	249	374/249 = 1,50
Mab2F11	0	176	0/176 = 0
hMab 2F11-e7	0	237	0/237 = 0
Mab 2E10	0	120	0/120 = 0
Mab 1G10	0	2708	0/2708 = 0
Mab 2H7	0	147	0/147 = 0
m<CCR5>Pz03.1C5	2	5	-

Mab 2F11 y Mab 2E10 mostraron unión al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (véase la fig. 2b); sin embargo, no se detectó unión al fragmento delD4 del CSF-1R. (Véase la fig. 2a).

Sc2-4A5 y MAB3291 mostraron unión al CSF-1R-ECD y a delD4 (véase la fig. 2b y 2a).

Por tanto, la proporción de unión de los anticuerpos anti-CSF1R Mab 2F11 y Mab 2E10 al fragmento delD4 del CSF1R/a CSF-1R-ECD estuvo claramente por debajo de 1:50 (= 0,02), mientras que la proporción de unión de MAB3291 y Sc2-4A5 fue de 1,61 y 1,50, respectivamente, y estuvieron muy por encima de 1:50 (= 0,02). El anticuerpo de control negativo m<CCR5>Pz03.1C5 no mostró ninguna unión (como se esperaba).

Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-e7 humanizado mostraron unión al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (véase la fig. 2d); sin embargo, no se detectó unión al fragmento delD4 del CSF-1R. (Véase la fig. 2c). Por tanto, la relación de unión de los anticuerpos anti-CSF1R Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-e7 humanizado al fragmento delD4 del CSF-1R /a CSF-1R-ECD estuvo claramente por debajo de 1:50 (= 0,02).

En otro experimento se investigaron anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM (ligando que desplaza el anticuerpo contra CSF-1R descrito en el documento WO2009026303), CXIIG6 (ligando que desplaza el anticuerpo contra CSF-1R descrito en el documento WO 2009/112245), el anticuerpo policlonal de cabra anti-CSF-1R ab10676 (abcam). Se usó el anticuerpo anti-CSF-1R Mab3291 (R&D-Systems) como control de referencia. Se usó anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18/08/2004 en DSMZ) como control negativo.

**Tabla 3b:**

**Unión de <CSF-1R> MAb al fragmento delD4 del CSF-1R humano y CSF-1R-ECD y proporción a 25 °C, medida por SPR**

	Unión a delD4 [RU]	Unión a CSF-1R-ECD [RU]	Proporción de unión de anticuerpos anti-CSF1R al fragmento delD4 del CSF1R / a CSF-1R-ECD
MAB3291	1790	1222	1790/1222 = 1,47
1.2.SM	469	704	469/704 = 0,67
CXIIG6	1983	1356	1983/1356 = 1,46
ab10676	787	547	787/547 = 1,44
m<CCR5>Pz03.1C5	0	0	-

1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 mostraron unión a CSF-1R-ECD y al delD4 (véase la fig. 2f y 2e).

La proporción de unión de 1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 fue muy superior a 1:50 (= 0,02). El anticuerpo de control negativo m<CCR5>Pz03.1C5 no mostró ninguna unión (como se esperaba).

**Ejemplo 5**

**Inhibición del crecimiento de células recombinantes NIH3T3-CSF-1R en cultivo 3D con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)**

Se cultivaron células NIH 3T3, infectadas retrovíricamente con un vector de expresión para CSF-1R natural de longitud completa (SEQ ID NO: 62) o CSF-1R L301S Y969F mutante (SEQ ID NO: 63) en medio DMEM con alto contenido de glucosa (PAA, Pasching, Austria) complementado con F-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 2 mM y aminoácidos no esenciales y suero fetal bovino al 10 % (Sigma, Taufkirchen, Alemania) en placas recubiertas con poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) (Polysciences, Warrington, PA, EE. UU.) para evitar la adherencia a la superficie de plástico. Las células se siembran en un medio que reemplaza al suero con 5 ng/ml de selenito de sodio, 10 mg/ml de transferrina, 400 µg/ml de BSA y 0,05 mM de 2-mercaptoetanol. Cuando se trata con 100 ng/ml de huCSF-1 (Biomol, Hamburgo, Alemania) wtCSF-1R (las células que expresan forman esferoides densos que crecen tridimensionalmente, una propiedad que se denomina independencia del anclaje. Estos esferoides se parecen mucho a la arquitectura tridimensional y la organización de tumores sólidos *in situ*. Las células recombinantes de CSF-1R mutante pueden formar esferoides independientes del ligando de CSF-1. Los cultivos de esferoides se incubaron durante 3 días en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo para determinar una CI<sub>50</sub> (concentración con un 50 por ciento de inhibición de la viabilidad celular). El ensayo CellTiterGlo se usó para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células.

**Tabla 5a:**

Mab CSF-1R	wtCSF-1R CI <sub>50</sub> [µg/ml]	CSF-1R Mutante CI <sub>50</sub> [µg/ml]
Mab 2F11	1,1	8,0
Mab 2E10	0,49	4,9
Mab 2H7	0,31	5,3
Mab 1G10	0,29	14,2

SC 2-4A5	10,0	10,0
----------	------	------

El control de referencia Mab R&D-Systems 3291 no mostró inhibición de la proliferación de células recombinantes de CSF-1R mutante.

- 5 En otro experimento, se investigaron el anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la invención hMab 2F11-e7 y los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM (ligando que desplaza el anticuerpo contra CSF-1R descrito en el documento WO2009026303), CXIIG6 (ligando que desplaza el anticuerpo contra CSF-1R descrito en el documento WO 2009/112245), el anticuerpo policlonal de cabra anti-CSF-1R ab 10676 (abcam) y SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU., véase también Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793).

10 Los cultivos de esferoides se incubaron durante 3 días en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo para determinar una  $CI_{30}$  (concentración con un 30 por ciento de inhibición de la viabilidad celular). La concentración máxima fue de 20  $\mu\text{g/ml}$ . El ensayo CellTiterGlo se usó para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células.

15

**Tabla 5b:**

Mab CSF-1R	wtCSF-1R $CI_{30}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CSF-1R Mutante $CI_{30}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
hMab2F11-e7	4,91	0,54
1.2.SM	1,19	>20 $\mu\text{g/ml}$ (-19 % de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$ = 19 % de estimulación)
CXIIG6	>20 $\mu\text{g/ml}$ (21 % de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$ )	>20 $\mu\text{g/ml}$ (-36% de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$ = 36% de estimulación)
ab10676	14,15	>20 $\mu\text{g/ml}$ (0% de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$ )
SC 2-4A5	16,62	2,56

### Ejemplo 6

20 **Inhibición del crecimiento de células tumorales BeWo en cultivo 3D con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)**

25 Se cultivaron células de coriocarcinoma (ATCC CCL-98) en medio F12K (Sigma, Steinheim, Alemania) complementado con FBS al 10 % (Sigma) y L-glutamina 2 mM. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) que contenían medio F12K complementado con FBS al 0,5 % y BSA al 5 %. Simultáneamente, se añadieron 200 ng/ml de huCSF-1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de diferentes anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R y se incubaron durante 6 días. El ensayo CellTiterGlo se usó para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células en unidades de luz relativa (RLU). Cuando se trataron cultivos de esferoides BeWo con diferentes anticuerpos anti-CSF-1R (10  $\mu\text{g/ml}$ ), se observó una inhibición del crecimiento inducido por CSF-1. Para calcular la inhibición mediada por anticuerpos, el valor medio de RLU de las células BeWo no estimuladas se sustrajo de todas las muestras. El valor medio de RLU de las células estimuladas con CSF-1 se estableció arbitrariamente a un 100 %. Los valores medios de RLU de las células estimuladas con CSL-1 y tratadas con anticuerpos anti-CSF-1R se calcularon en % de RLU estimuladas con CSF-1. La Tabla 6 muestra los datos calculados de la inhibición del crecimiento de células tumorales BeWo en cultivo en 3D con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R; la fig. 1a y b representan valores medios de RLU normalizados.

35

**Tabla 6:**

Mab CSF-1R	% de inhibición concentración de anticuerpo 10 $\mu\text{g/ml}$
Solo CSF-1	0
Mab 2F11	70
Mab 2E10	102
Mab 2H7	103
Mab 1G10	99
SC 2-4A5	39

40

### Ejemplo 7

**Inhibición de la diferenciación de macrófagos humanos con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)**

Se aislaron monocitos humanos de la sangre periférica utilizando el cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep™ (StemCell Tech. - n.º de cat. 15028). Se sembraron poblaciones de monocitos enriquecidas en placas de microtitulación de 96 pocillos ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo) en 100 µl de RPMI 1640 (Gibco - n.º de cat. 31870) complementado con FCS al 10 % (GIBCO - n.º de cat. 11-090014M), L-glutamina 4 mM (GIBCO - n.º de cat. 25030) y 1x PenStrep (Roche n.º de cat. 1 074 440) a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en una atmósfera humidificada. Cuando se le añadió 150 ng/ml de huCSF-1 al medio, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos adherentes. Esta diferenciación se podía inhibir mediante la adición de anticuerpos anti-CSF-1R. Además, la supervivencia de los monocitos está afectada y se podía analizar mediante el análisis CellTiterGlo (CTG). A partir de la inhibición dependiente de la concentración de la supervivencia de los monocitos mediante el tratamiento con anticuerpos, se calculó una CI<sub>50</sub> (véase la Tabla 7).

Tabla 7:

Mab CSF-1R	CI <sub>50</sub> [µg/ml]
Mab 2F11	0,08
Mab 2E10	0,06
Mab 2H7	0,03
Mab 1G10	0,06
SC 2-4A5	0,36

En una serie de pruebas separada, las versiones humanizadas de Mab 2 F11, por ejemplo, hMab 2F11-c11, hMab 2F11-d8, hMab 2F11-e7, hMab 2F11-f12, mostraron valores de CI<sub>50</sub> de 0,07 µg/ml (hMab 2F11-c11), 0,07 µg/ml (hMab 2F11-d8), 0,04 µg/ml (hMab 2F11-e7) y 0,09 µg/ml (hMab 2F11-f12).

### Ejemplo 8

#### **Inhibición de la diferenciación de macrófagos de macacos de Java con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)**

Se aislaron monocitos de macacos de Java de la sangre periférica usando el kit de primates no humanos CD 14 MicroBeads (Miltenyi Biotec - n.º de cat. 130-091-097) de acuerdo con la descripción del fabricante. Se sembraron poblaciones de monocitos enriquecidas en placas de microtitulación de 96 pocillos ( $1-3 \times 10^4$  células/pocillo) en 100 µl de RPMI 1640 (Gibco - n.º de cat. 31870) complementado con FCS al 10 % (GIBCO - n.º de cat. 11-090014M), L-glutamina 4 mM (GIBCO - n.º de cat. 25030) y 1x PenStrep (Roche n.º de cat. 1 074 440) a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en una atmósfera humidificada. Cuando se le añadió 150 ng/ml de huCSF-1 al medio, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos adherentes. Esta diferenciación se podía inhibir mediante la adición de anticuerpos anti-CSF-1R. Además, la supervivencia de los monocitos está afectada y se podía analizar mediante el análisis CellTiterGlo (CTG). La viabilidad se analizó a una concentración de 5 µg/ml del tratamiento con anticuerpos (véase la Tabla 8).

Tabla 8:

Mab CSF-1R	% de supervivencia	% de inhibición (de supervivencia) = (100 % - % de supervivencia)
Mab2F11	4 *	96
Mab 2E10	17**	83
Mab 2H7	8	92
Mab 1G10	2	98
SC 2-4A5	31	69

\* media de cuatro experimentos (3 expts. usando el murino, 1 expt. usando el mAb quimérico)

\*\* media de dos experimentos usando el mAb murino solamente

### Ejemplo 9

#### **Determinación de la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CSF-1R al CSF-1R humano**

45

Instrumento: BIACORE® A100  
 Chip: CM5 (Biacore BR-1006-68)  
 Acoplamiento: acoplamiento de aminas  
 Tampón: PBS (Biacore BR-1006-72), pH 7,4, 35 °C

Para las mediciones de afinidad, se han acoplado 36 µg/ml de anticuerpos Fcγ contra inmunoglobulinas de ratón (de cabra, Jackson Immuno Reasearch JIR115-005-071) a la superficie del chip para capturar los anticuerpos contra CSF-1R. Se le añadió dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (R&D-Systems 329-MR o pCMV-presS-HisAvitag-hCSF-1R-ECD subclonado) en diversas concentraciones en solución. La asociación se midió mediante una inyección de CSF-1R de 1,5 minutos a 35 °C; la disociación se midió lavando la superficie del chip con tampón durante 10 minutos a 35 °C. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se utilizó el modelo 1:1 de Langmuir.

**Tabla 9:**

**Datos de afinidad medidos por SPR**

Mab CSF-1R	K <sub>d</sub> (nM)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	t <sub>1/2</sub> (min)
Mab 2F11	0,29	1,77E+05	5,18E-05	223
Mab 2E10	0,2	1,52E+05	2,97E-05	389
Mab 2H7	0,21	1,47E+05	3,12E-05	370
Mab 1G10	0,36	1,75E+05	6,28E-05	184

En un ensayo separado de unión de biacore usando el CSF-1R-ECF (datos no mostrados), se mostró cierta competencia de los anticuerpos Mab 2F11 y Mab 2E10 con el anticuerpo Ab SC-2-4A5. Sin embargo, Mab 2F11/Mab 2E10 no se unen al fragmento delD4 del CSF-1R humano, mientras que Ab SC-2-4A5 se une a este fragmento delD4 (véase el ejemplo 4 y la fig. 2a). Por tanto, la región de unión de Mab 2F11/Mab 2E10 es claramente distinta de la región de unión de Ab SC-2-4A5, pero probablemente está situada en un área cercana. En dicho ensayo de competencia, los anticuerpos Mab 2F11 y Mab 2E10 no compitieron con Mab3291 de R&D-Systems (datos no mostrados).

**Ejemplo 10**

**Determinación de la unión de los anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento D1-D3 del CSF-1R**

Instrumento: Biacore T100 (GE Healthcare)  
 Programa informático: Control T100, Versión 1.1.11  
 Evaluación B3000, Versión 4.01  
 Scrubber, Versión 2.0a

Formato de ensayo Chip: CM5-Chip

Los anticuerpos contra el CSF-1R se capturaron por medio de moléculas de captura acopladas con aminas. Usando la cinética de un solo ciclo, se inyectaron cinco concentraciones crecientes del fragmento D1-D3 del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 66). El fragmento D1-D3 del CSF-1R humano se subclonó en el vector de expresión pCMV-presS-HisAvitag.

Se usaron anti CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.; Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793) que inhibe la interacción ligando-receptor, y Mab 3291 (R&D-Systems) como controles de referencia.

Moléculas de captura: Anticuerpos contra Fcγ de ratón (de cabra, Jackson Immuno Reasearch JIR115-005-071) para los anticuerpos de acuerdo con la invención y Mab 3291 de control de R&D-Systems y anticuerpos anti-Fcγ de rata (de cabra, Jackson Immuno Reasearch JIR112-005-071) para el control de referencia anti CSF-1R SC 2-4A5.

**Acoplamiento de aminas de las moléculas de captura.**

Acoplamiento estándar de aminas de acuerdo con las instrucciones del fabricante: tampón de migración: tampón HBS-N, activación por mezcla de EDC/NHS, objetivo para la densidad del ligando de 2000 RU; los Abs de captura se diluyeron en un tampón de acoplamiento NaAc, pH 4,5, c = 10 µg/ml; finalmente, los grupos carboxilo activados restantes se bloquearon mediante inyección de etanolamina 1 M.

**Caracterización cinética de los fragmentos D1-D3 del CSF-1R humano que se unen a MAb <CSF-1R> a 37 °C**

Tampón de migración: PBS (Biacore BR-1006-72)

Captura de Mab <CSF-1R> en las cubetas de lectura 2 a 4: Caudal 20 µl/min, tiempo de contacto 90 segundos, c(Abs<CSF-1R>) = 50 nM, diluido con tampón de migración + 1 mg/ml de BSA;

Muestra de analito:

La cinética de un solo ciclo se midió a un caudal de 30 µl/min mediante cinco inyecciones consecutivas del analito con concentraciones, c = 7,8, 31,25, 125, 500 y 2000 nM, sin regeneración. Cada inyección duró 30 segundos y fue seguida de una fase de disociación de 120 segundos para las primeras cuatro inyecciones, y finalmente 1200 segundos para la concentración más alta (= última inyección).

La regeneración final se realizó después de cada ciclo usando glicina 10 mM, pH 1,5 (Biacore BR-1003-54), tiempo de contacto 60 segundos, caudal 30 µl/min.

Los parámetros cinéticos se calcularon usando la doble referencia habitual (referencia de control: unión del analito a la molécula de captura; cubeta de lectura: concentración de CSF-1R del subdominio "0" como blanco) y cálculo con el modelo 'Cinética de valoración, unión 1:1 con borrador'.

**Tabla 10:**

**Datos de afinidad para la unión del fragmento D1-D3 del CSF-1R humano medida por SPR**

Mab CSF-1R	Subdominio	K <sub>d</sub> (nM)	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	t <sub>1/2</sub> (min)
Mab 2F11	D1-D3	sin unión			
Mab 2E10	D1-D3	sin unión			
Mab 2H7	D1-D3	no determinado			
Mab 1G10	D1-D3	sin unión			
SC-2-4A5	D1-D3	sin unión			
R&D-Systems 3291	D1-D3	5,4	2,2E <sup>+5</sup>	1,2E <sup>-3</sup>	9,6

Los anticuerpos Mab 2F11, Mab 2E10 y Mab 1G10 no mostraron unión al fragmento D1-D3 del CSF-1R humano.

El control de referencia Ab SC-2-4A5 tampoco se unió al fragmento D1-D3 del CSF-1R humano.

El control de referencia Mab R&D-Systems 3291 mostró unión al fragmento D1-D3 del CSF-1R humano.

### **Ejemplo 11**

#### **Aumento del nivel de CSF-1 durante la inhibición del CSF-1R en macaco de Java**

Los niveles séricos de CSF-1 proporcionan un marcador farmacodinámico de la actividad neutralizante de CSF-1R del inhibidor de la dimerización anti-CSF-1R humano hMab 2F11-e7. Se administró por ruta intravenosa a un macho y una hembra de macaco de Java por grupo de dosificación (1 y 10 mg/kg) anticuerpo anti-CSF1R hMab 2F11-e7. Se recogieron muestras de sangre para el análisis de los niveles de CSF-1 1 semana antes del tratamiento (antes de la dosis), 2, 24, 48, 72, 96, 168 horas después de la dosis y semanalmente durante dos semanas adicionales. Los niveles de CSF-1 se determinaron usando un kit disponible comercialmente de ELISA (Quantikine® M-CSF humano) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Reino Unido). El nivel de CSF-1 en los macacos se determinó por comparación con las muestras de curva estándar de CSF-1 proporcionadas en el kit.

La administración de hMab 2F11-e7 indujo un aumento espectacular de CSF-1 en aproximadamente 1000 veces, que, dependiendo de la dosis administrada, duró 48 horas (1 mg/kg) o 15 días (10 mg/kg). Por lo tanto, un inhibidor de la dimerización para el CSF-1R ofrece la ventaja de no competir directamente con el ligando drásticamente regulado por incremento para unirse al receptor en contraste con un ligando que desplaza un anticuerpo.

### **Ejemplo 12**

#### **Eficacia *in vivo*: inhibición del crecimiento tumoral de anticuerpos anti-CSF-1R en células tumorales de xenoinjerto BT20 de cáncer de mama en ratones beige SCID**

La línea celular BT-20 de cáncer de mama humano expresa CSF-1R humano pero carece de expresión de CSF-1 (Sapi, E. *et al.* Cancer Res 59 (1999) 5578-5585). Dado que el CSF-1 derivado del ratón no puede activar el CSF-1R humano en las células tumorales, el CSF-1 humano recombinante (Biomol, Hamburgo, Alemania) se complementó por medio de minibombas osmóticas (ALZET, Cupertino, CA) que proporcionan una tasa de infusión continua de CSF-1 de 2 µg/día (Martin, TA, Carcinogenesis 24 (2003) 1317-1323).

5 Para comparar directamente la eficacia de un anticuerpo que interfiere en la dimerización del CSF-1R con un ligando que desplaza el anticuerpo contra el CSF-1R, los autores sometieron a prueba el anti-CSF-1R Mab 2F11 quimérico (anticuerpo que interfiere en la dimerización del CSF-1R) y 1.2.SM (ligando que desplaza el anticuerpo CSF-1R descrito en el documento WO2009026303) en el modelo de xenoinjerto BT-20.

10 Se inyectó por ruta subcutánea a ratones beige SCID (Charles River, Sulzfeld, Alemania)  $1 \times 10^7$  células BT-20 (ATCC HTB-19) y 100  $\mu$ l de Matrigel. El tratamiento de los animales comenzó el día de la aleatorización a un volumen tumoral medio de 100  $\text{mm}^3$ . Los ratones se tratan una vez a la semana por ruta i.p. con los respectivos anticuerpos (véase la figura 4) en tampón de histidina 20 mM, NaCl 140 mM pH 6,0. Las dimensiones del tumor se miden por un calibre comenzando el día de la estadificación y, posteriormente, 2 veces a la semana durante todo el período de tratamiento. El volumen del tumor se calcula de acuerdo con el protocolo del NCI (peso del tumor =  $1/2ab^2$ , donde "a" y "b" son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente).

15 El análisis del crecimiento tumoral se muestra en la figura 4. La inhibición del CSF-1R humano en células tumorales con el anti-CSF-1R Mab 2F11 quimérico fue estadísticamente más eficaz para mediar la inhibición del crecimiento tumoral que el anticuerpo anti-CSF-1R 1.2.SM (anticuerpo contra CSF-1R descrito en el documento WO2009026303).

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> ANTICUERPOS QUE SE UNEN PREFERENTEMENTE AL DOMINIO EXTRACELULAR 4 DE CSF1R Y SU USO

<130> P26143-EP-5

10 <150> EP09015310.7  
<151> 10/12/2009

<150> EP10173407.7  
<151> 19/08/2010

15 <160> 84

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

25 <400> 1

**Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val**  
**1 5**

<210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 2

35 **Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 3  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 3

**Thr Tyr Asp Ile Ser**  
**1 5**

45 <210> 4  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 4

**Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr**  
**1 5**

55 <210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

60 <400> 5

ES 2 722 300 T3

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 6

Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 7  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 7

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Lys Met Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 8  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 8

ES 2 722 300 T3

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 9  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 9

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp  
 1 5

<210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 10

Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met Ser  
 1 5 10 15

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

<400> 11

Ser Phe Asp Ile Ser  
 1 5

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 12

ES 2 722 300 T3

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 13

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 14  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 15  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 15

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe  
20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met  
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu  
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 16  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

ES 2 722 300 T3

<400> 16

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

5

<210> 17  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-c11

15

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Va:  
 1 5

20

<210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-c11  
 <400> 18

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser  
 1 5 10 15

30

<210> 19  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35

<220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-c11

<400> 19

**Thr Tyr Asp Ile Ser**  
**1 5**

5 <210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-c11  
 <400> 20

**Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr**  
**1 5**

15 <210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-c11

25 <400> 21

**Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr**  
**1 5**

30 <210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-c11

<400> 22

**Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser**  
**1 5 10**

40 <210> 23  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-c11

<400> 23

50

ES 2 722 300 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 24  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-c11

10

<400> 24

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

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

ES 2 722 300 T3

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
 85 90 95

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

5 <210> 25  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-d8  
 <400> 25

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
 1 5  
 15 <210> 26  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-d8  
 <400> 26

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly  
 25 1 5 10 15  
 <210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-d8  
 35 <400> 27

Thr Tyr Asp Ile Ser  
 1 5

40 <210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-d8

<400> 28

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

5 <210> 29  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-d8

<400> 29

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

15 <210> 30  
<211> 11  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-d8

25 <400> 30

Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

30 <210> 31  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-d8

<400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
20 25 30

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

ES 2 722 300 T3

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 32  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-d8

10

<400> 32

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
85 90 95

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

15

<210> 33  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-e7

<400> 33

**Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val**  
**1 5**

5 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-e7

<400> 34

**Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly**  
**1 5 10 15**

15 <210> 35  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-e7

25 <400> 35

**Ser Tyr Asp Ile Ser**  
**1 5**

30 <210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-e7

<400> 36

**Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr**  
**1 5**

40 <210> 37  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-e7

<400> 37

50 **Ala Ala Ser Asn Arg Tyr Thr**  
**1 5**

55 <210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-e7

<400> 38

ES 2 722 300 T3

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-e7

10

<400> 39

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln  
 50 55 60

Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 40  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-e7

20

<400> 40

ES 2 722 300 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
 85 90 95

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

5 <210> 41  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-f12  
 <400> 41

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
 1 5

15 <210> 42  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-f12  
 <400> 42

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser  
 1 5 10 15

30 <210> 43  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-f12  
 <400> 43

Thr Tyr Asp Ile Ser  
 1 5

ES 2 722 300 T3

<210> 44  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-f12  
 <400> 44  
 10  
**Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr**  
**1 5**  
 <210> 45  
 <211> 7  
 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-f12  
 20  
 <400> 45  
**Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
**1 5**  
 25  
 <210> 46  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-f12  
 <400> 46  
**Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser**  
**1 5 10**  
 35  
 <210> 47  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 40  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-f12  
 45  
 <400> 47  
**Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser**  
**1 5 10 15**  
**Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr**  
**20 25 30**  
**Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met**  
**35 40 45**  
**Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met**  
**50 55 60**

ES 2 722 300 T3

Ser Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 48  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-f12

<400> 48

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
85 90 95

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

<210> 49  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-g1

<400> 49

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

ES 2 722 300 T3

<210> 50  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-g1  
  
 10 <400> 50  
  
**Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser**  
**1 5 10 15**  
  
 <210> 51  
 15 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> CDR1 de cadena pesada, hMab 2F11-g1  
  
 <400> 51  
  
**Thr Tyr Asp Ile Ser**  
**1 5**  
 25  
 <210> 52  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> CDR3 de cadena ligera, hMab 2F11-g1  
  
 <400> 52  
 35  
**Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr**  
**1 5**  
  
 <210> 53  
 40 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> CDR2 de cadena ligera, hMab 2F11-g1  
  
 <400> 53  
  
**Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr**  
**1 5**  
 50  
 <210> 54  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> CDR1 de cadena ligera, hMab 2F11-g1  
  
 <400> 54  
 60  
**Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Leu Ala**  
**1 5 10**  
  
 <210> 55

ES 2 722 300 T3

<211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> dominio variable de cadena pesada, hMab 2F11-g1

<400> 55

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr  
 20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

10 Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 56  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> dominio variable de cadena ligera, hMab 2F11-g1

20 <400> 56

ES 2 722 300 T3

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
 85 90 95

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

<210> 57  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 57

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

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

10

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 58  
 <211> 330  
 <212> PRT

15

ES 2 722 300 T3

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

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

5 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

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

ES 2 722 300 T3

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 59

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> región constante de cadena pesada humana derivada de IgG1 mutada en L234A y L235A

<400> 59

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

ES 2 722 300 T3

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

ES 2 722 300 T3

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 60  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 60

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

10

ES 2 722 300 T3

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

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

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 61  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> región constante de cadena pesada humana derivada de IgG4 mutada en S228P

<400> 61

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

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

5

10

ES 2 722 300 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

ES 2 722 300 T3

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 62  
 <211> 972  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 722 300 T3

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg  
 180 185 190  
 Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val  
 195 200 205  
 Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys  
 210 215 220  
 Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn  
 225 230 235 240  
 Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg  
 245 250 255  
 Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His  
 260 265 270  
 Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser  
 275 280 285  
 Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser  
 290 295 300  
 Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp  
 325 330 335  
 Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala  
 340 345 350  
 Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu  
 355 360 365  
 Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg  
 370 375 380  
 Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr  
 405 410 415  
 Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu

ES 2 722 300 T3

			420					425					430			
Gln	Cys	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Gln	
		435					440					445				
Val	Trp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	Glu	Pro	Phe	His	
	450					455					460					
Lys	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	His	Asn	
465					470					475					480	
Gln	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Ala	His	Asn	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Trp	
				485					490					495		
Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	His	Thr	His	Pro	Pro	Asp	Glu	
			500					505					510			
Phe	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Val	Ala	Cys	Met	Ser	Ile	Met	Ala	Leu	
		515					520					525				
Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Gln	Lys	Pro									
	530					535					540					
Lys	Tyr	Gln	Val	Arg	Trp	Lys	Ile	Ile	Glu	Ser	Tyr	Glu	Gly	Asn	Ser	
545					550					555					560	
Tyr	Thr	Phe	Ile	Asp	Pro	Thr	Gln	Leu	Pro	Tyr	Asn	Glu	Lys	Trp	Glu	
				565					570					575		
Phe	Pro	Arg	Asn	Asn	Leu	Gln	Phe	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	
			580					585					590			
Phe	Gly	Lys	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Lys	Glu	Asp	
		595					600					605				
Ala	Val	Leu	Lys	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Ser	Thr	Ala	His	Ala	
	610					615					620					
Asp	Glu	Lys	Glu	Ala	Leu	Met	Ser	Glu	Leu	Lys	Ile	Met	Ser	His	Leu	
625					630					635					640	
Gly	Gln	His	Glu	Asn	Ile	Val	Asn	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	His	Gly	
				645					650					655		
Gly	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Thr	Glu	Tyr	Cys	Cys	Tyr	Gly	Asp	Leu	Leu	
			660					665					670			

ES 2 722 300 T3

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser  
 675 680 685  
 Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu  
 690 695 700  
 Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val  
 705 710 715 720  
 Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser  
 725 730 735  
 Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu  
 740 745 750  
 Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe  
 755 760 765  
 Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val  
 770 775 780  
 Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala  
 785 790 795 800  
 Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg  
 805 810 815  
 Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr  
 820 825 830  
 Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile  
 835 840 845  
 Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys  
 850 855 860  
 Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe  
 865 870 875 880  
 Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu  
 885 890 895  
 Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu  
 900 905 910  
 Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser  
 915 920 925

ES 2 722 300 T3

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

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

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

<210> 63  
 <211> 972  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> CSF-1R mutante L301S, Y969F

10

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 722 300 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala  
 340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu  
 355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg  
 370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr  
 385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr  
 405 410 415

ES 2 722 300 T3

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu  
 420 425 430  
 Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln  
 435 440 445  
 Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His  
 450 455 460  
 Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn  
 465 470 475 480  
 Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp  
 485 490 495  
 Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu  
 500 505 510  
 Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu  
 515 520 525  
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro  
 530 535 540  
 Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser  
 545 550 555 560  
 Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu  
 565 570 575  
 Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala  
 580 585 590  
 Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp  
 595 600 605  
 Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala  
 610 615 620  
 Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu  
 625 630 635 640  
 Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly  
 645 650 655  
 Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu  
 660 665 670

ES 2 722 300 T3

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser  
 675 680 685  
 Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu  
 690 695 700  
 Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val  
 705 710 715 720  
 Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser  
 725 730 735  
 Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu  
 740 745 750  
 Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe  
 755 760 765  
 Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val  
 770 775 780  
 Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala  
 785 790 795 800  
 Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg  
 805 810 815  
 Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr  
 820 825 830  
 Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile  
 835 840 845  
 Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys  
 850 855 860  
 Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe  
 865 870 875 880  
 Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu  
 885 890 895  
 Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu  
 900 905 910  
 Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser

ES 2 722 300 T3

915 920 925

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

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala  
945 950 955 960 965

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

<210> 64  
 <211> 493  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> dominio extracelular del CSF-1R humano

10 <400> 64

Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp  
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser  
35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg  
50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu  
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val  
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp  
100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro  
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr  
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala  
145 150 155 160

ES 2 722 300 T3

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val  
 165 170 175  
 Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu  
 180 185 190  
 Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser  
 195 200 205  
 Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys  
 210 215 220  
 Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys  
 225 230 235 240  
 Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn  
 245 250 255  
 Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met  
 260 265 270  
 Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln  
 275 280 285  
 Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val  
 290 295 300  
 Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu  
 305 310 315 320  
 Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr  
 325 330 335  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu  
 340 345 350  
 Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly  
 355 360 365  
 Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu  
 370 375 380  
 Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys  
 385 390 395 400  
 Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser



ES 2 722 300 T3

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr  
 130 135 140  
 Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val  
 165 170 175  
 Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu  
 180 185 190  
 Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser  
 195 200 205  
 Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys  
 210 215 220  
 Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys  
 225 230 235 240  
 Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn  
 245 250 255  
 Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met  
 260 265 270  
 Phe Phe Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn  
 275 280 285  
 Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn  
 290 295 300  
 Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala  
 305 310 315 320  
 Gln Val Leu Gln Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln  
 325 330 335  
 Glu Pro Phe His Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr  
 340 345 350  
 Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly  
 355 360 365  
 Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His

ES 2 722 300 T3

370

375

380

Pro Pro Asp Glu  
385

<210> 66  
<211> 292  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> fragmento D1-D3 del CSF-1R humano

10

<400> 66

Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly  
1 5 10 15

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp  
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser  
35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg  
50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu  
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val  
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp  
100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro  
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr  
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala  
145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val  
165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu  
180 185 190

ES 2 722 300 T3

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser  
 195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys  
 210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys  
 225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn  
 245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met  
 260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln  
 275 280 285

Asn Leu Ile Gln  
 290

5 <210> 67  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> péptido señal

<400> 67

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

Trp His Gly Gln Gly  
 20

15 <210> 68  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 68

cacctccatg ttcttccggt acccccaga ggtaag

36

25 <210> 69  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

30 <400> 69

ES 2 722 300 T3

**Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val**  
**1 5**  
 <210> 70  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 70  
**Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser**  
 10 **1 5 10 15**  
 <210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
 <400> 71  
**Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Ile Ser**  
 20 **1 5 10**  
 <210> 72  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
 <400> 72  
**Gly Gln Ser Phe Thr Tyr Pro Thr**  
 30 **1 5**  
 <210> 73  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 35 <400> 73  
**Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr**  
 40 **1 5**  
 <210> 74  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 74  
 45 **Lys Ala Ser Glu Asp Val Gly Thr Tyr Val Ser**  
**1 5 10**  
 <210> 75  
 <211> 116  
 50 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 75

ES 2 722 300 T3

Arg Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr  
20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met  
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asp Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Lys Val Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 76  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

5

<400> 76

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

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

10

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

ES 2 722 300 T3

	65				70					75					80	
	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Ser	Cys	Gly	Gln	Ser	Phe	Thr	Tyr	Pro	Thr
					85					90					95	
	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
				100						105						
	<210>	77														
	<211>	8														
5	<212>	PRT														
	<213>	Mus musculus														
	<400>	77														
	Asp	Pro	Arg	Leu	Tyr	Phe	Asp	Val								
10	1				5											
	<210>	78														
	<211>	16														
	<212>	PRT														
15	<213>	Mus musculus														
	<400>	78														
	Val	Ile	Trp	Thr	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Gly	Phe	Met	Ser
20	1				5					10					15	
	<210>	79														
	<211>	10														
	<212>	PRT														
	<213>	Mus musculus														
25	<400>	79														
	Gly	Ser	Ser	Leu	Asp	Ser	Phe	Asp	Ile	Ser						
30	1				5					10						
	<210>	80														
	<211>	8														
	<212>	PRT														
	<213>	Mus musculus														
35	<400>	80														
	Gly	Gln	Thr	Phe	Ser	Tyr	Pro	Thr								
40	1				5											
	<210>	81														
	<211>	7														
	<212>	PRT														
	<213>	Mus musculus														
45	<400>	81														
	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr									
50	1				5											
	<210>	82														
	<211>	11														
	<212>	PRT														
	<213>	Mus musculus														

ES 2 722 300 T3

<400> 82

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser  
 1 5 10

- 5 <210> 83
- <211> 116
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

10 <400> 83

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe  
 20 25 30

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met  
 50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95

Arg Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
 100 105 110

Thr Val Ser Ser  
 115

- 15 <210> 84
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

20 <400> 84

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15

ES 2 722 300 T3

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr  
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

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

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

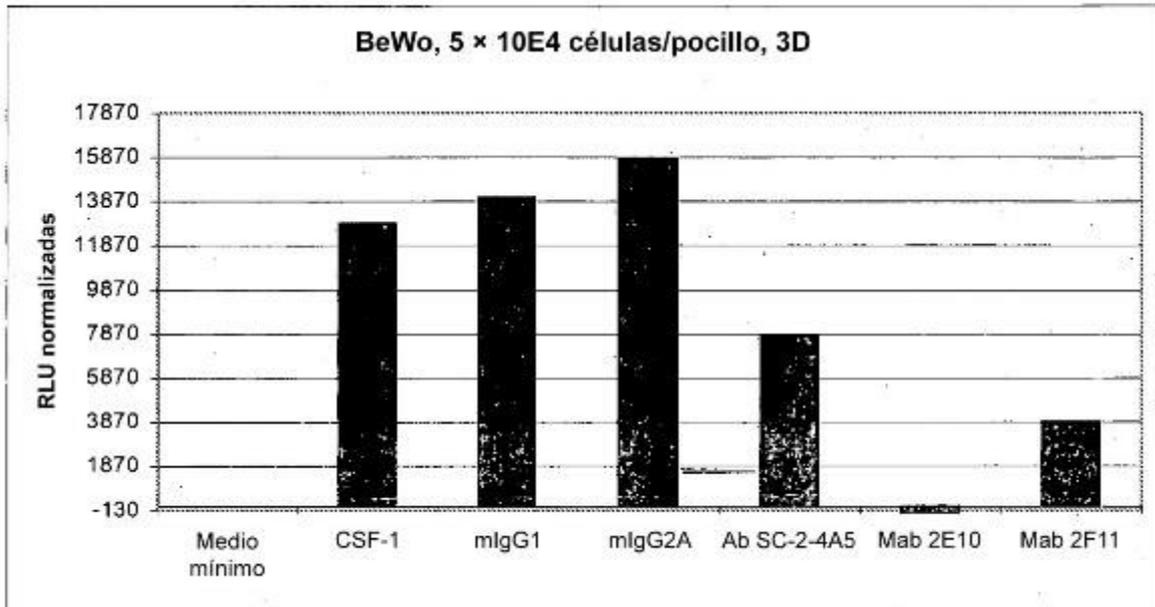
**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une al receptor del factor estimulante de colonias 1 humano (CSF-1R), caracterizado por que el anticuerpo se une al dominio extracelular del CSF-1R humano de SEQ ID NO: 64, y no se une al fragmento del D4 del CSF-1R humano de SEQ. ID NO: 65.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que
  - a) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 16;
  - b) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 75 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 76;
  - c) el dominio variable de cadena pesada es SEQ ID NO: 83 y el dominio variable de cadena ligera es SEQ ID NO: 84;
 o una versión humanizada del mismo.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que
  - a) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 9, una región CDR2 de SEQ ID NO: 10 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 11, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 12, una región CDR2 de SEQ ID NO: 13 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 14, o
  - b) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 69, una región CDR2 de SEQ ID NO: 70 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 71, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 72, una región CDR2 de SEQ ID NO: 73 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 74, o
  - c) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 77, una región CDR2 de SEQ ID NO: 78 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 79, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 80, una región CDR2 de SEQ ID NO: 81 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 82.
4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG1 humana o es de la subclase IgG4 humana.
5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que dicho anticuerpo es de la subclase IgG1 humana.
6. Una composición farmacéutica caracterizada por comprender un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5.
7. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento del cáncer.
8. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de la disminución de la masa ósea.
9. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en la prevención o el tratamiento de metástasis.
10. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.
11. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5.
12. Un vector de expresión caracterizado por comprender un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 para la expresión del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 en una célula huésped procarionta o eucariota.
13. Una célula huésped procarionta o eucariota que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por expresar un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 en una célula huésped

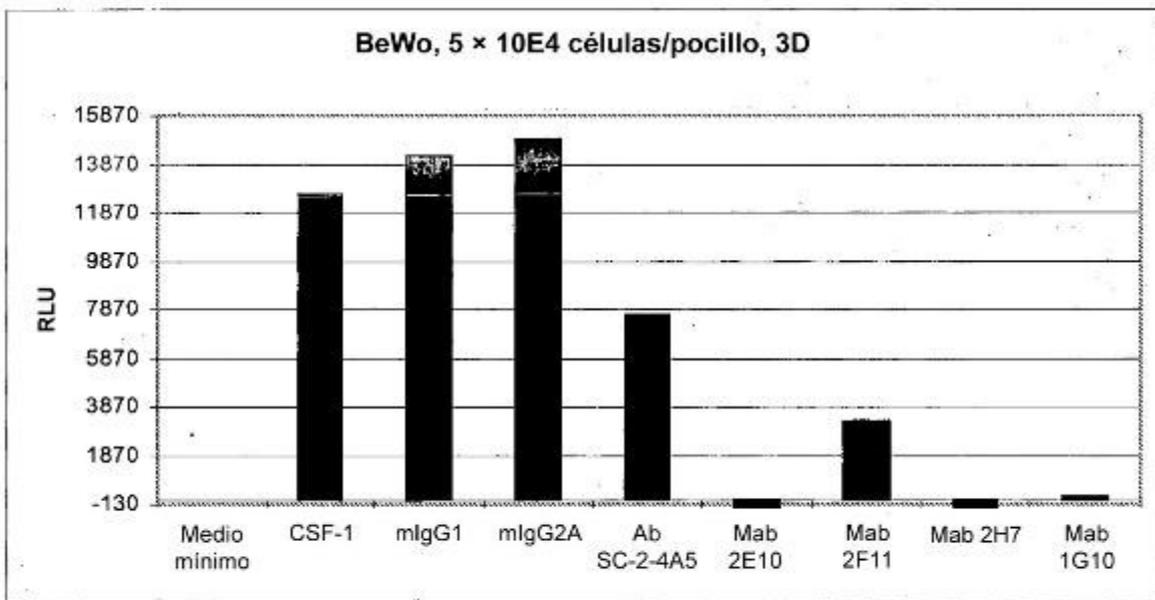
procariota o eucariota y recuperar dicho anticuerpo de dicha célula o el sobrenadante de cultivo celular.

- 5
15. Uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
16. Uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la disminución de la masa ósea.
- 10
17. Uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de metástasis.
18. Uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

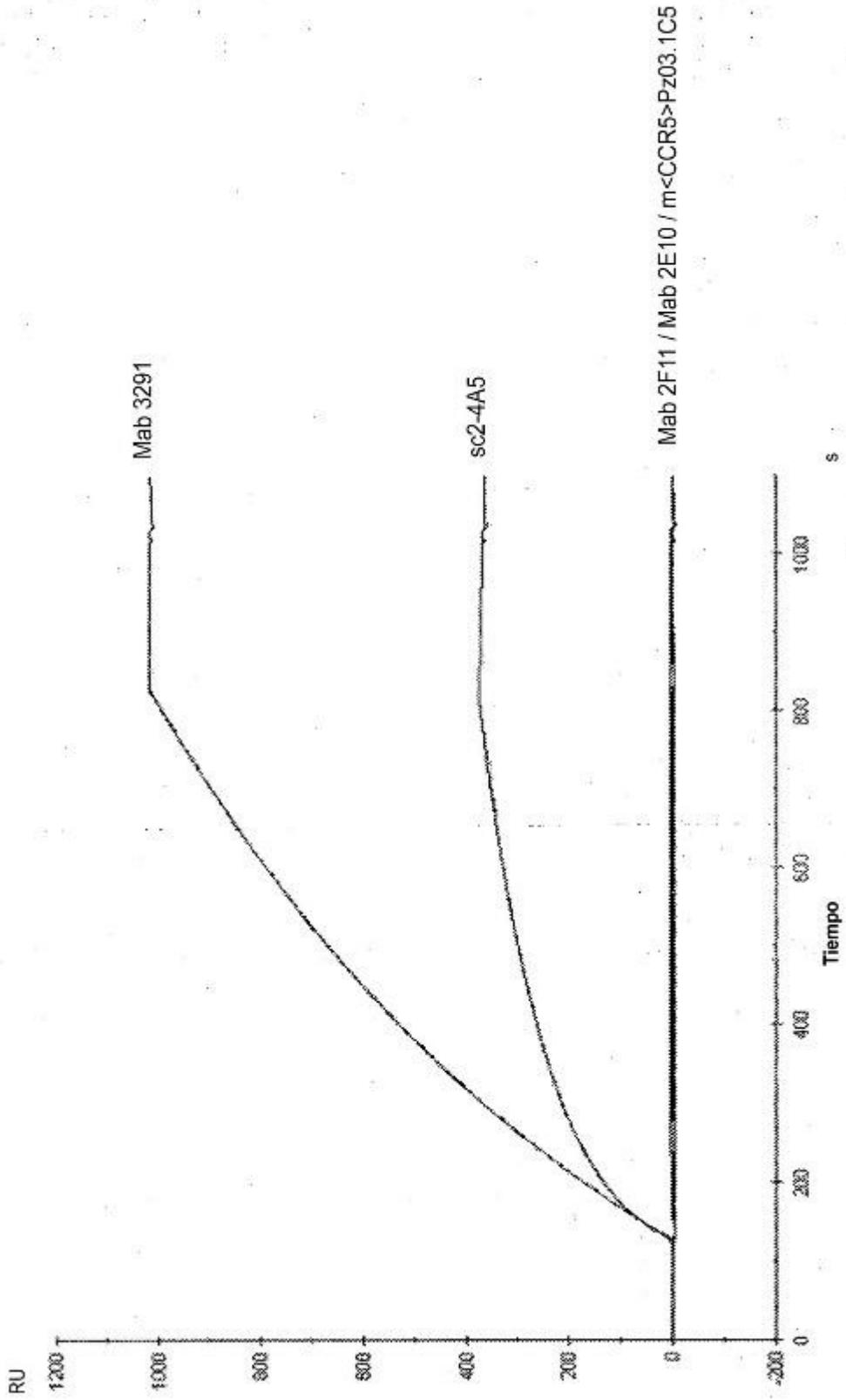
**Fig. 1a**



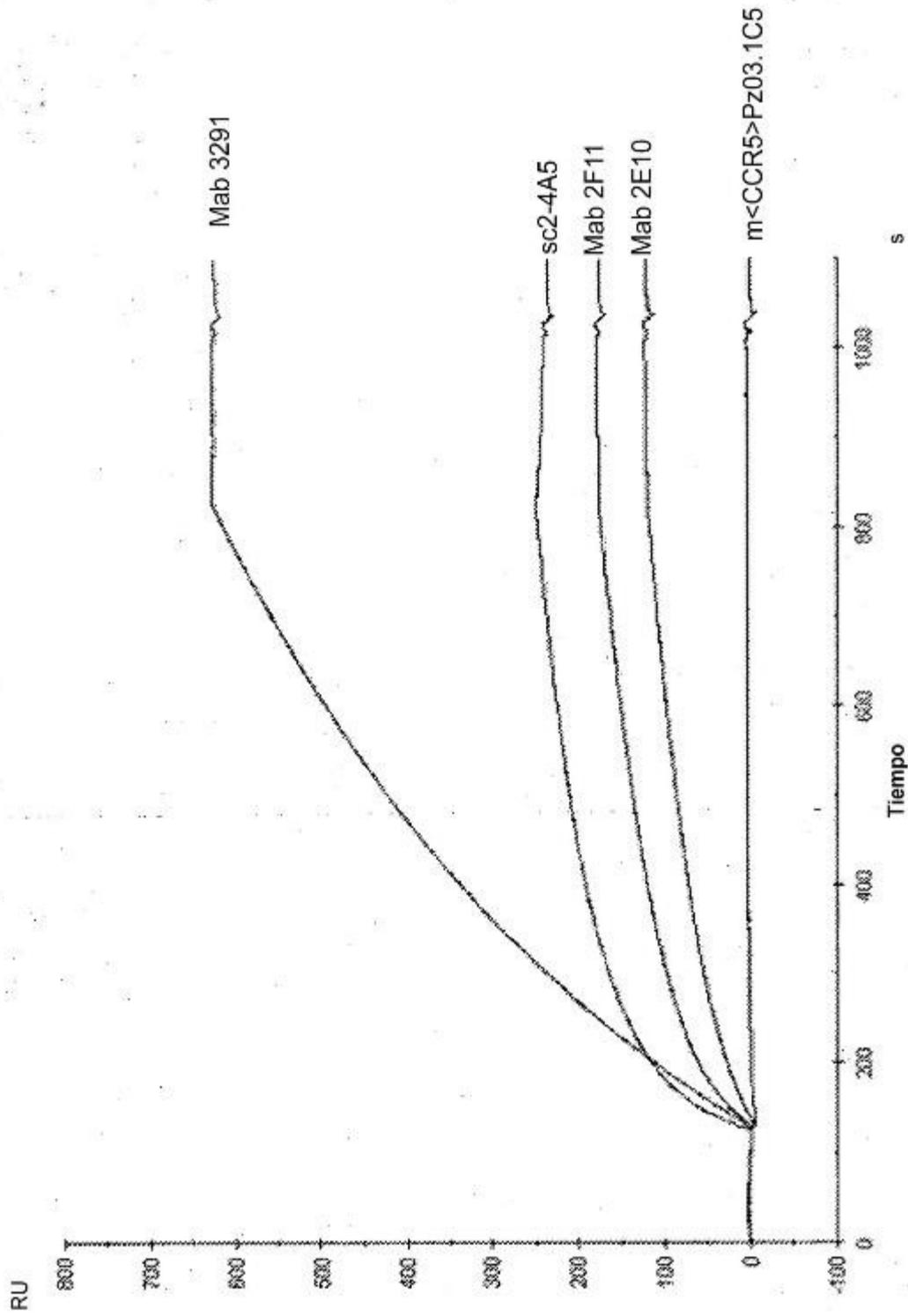
**Fig. 1b**



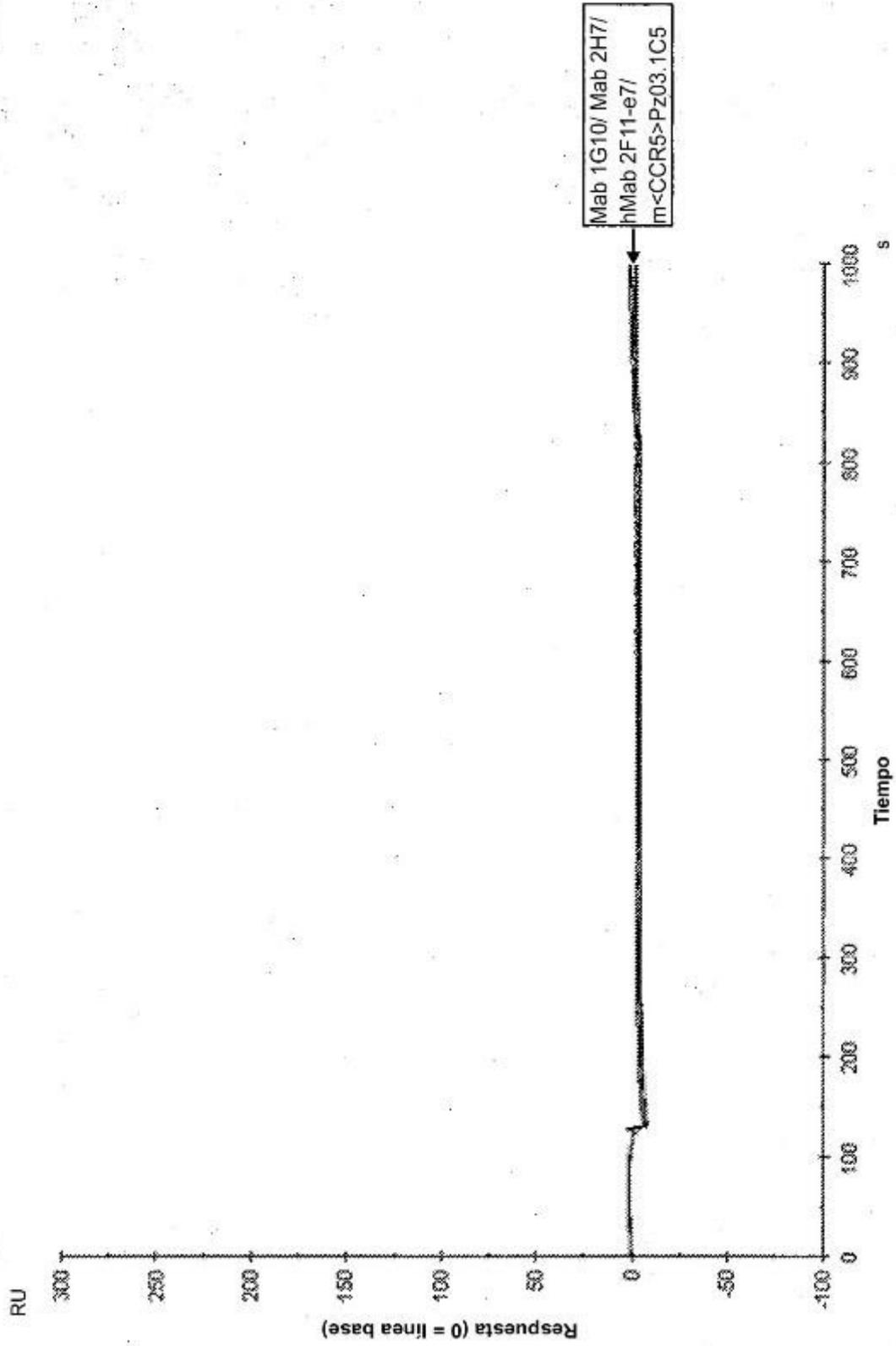
**Fig. 2a**



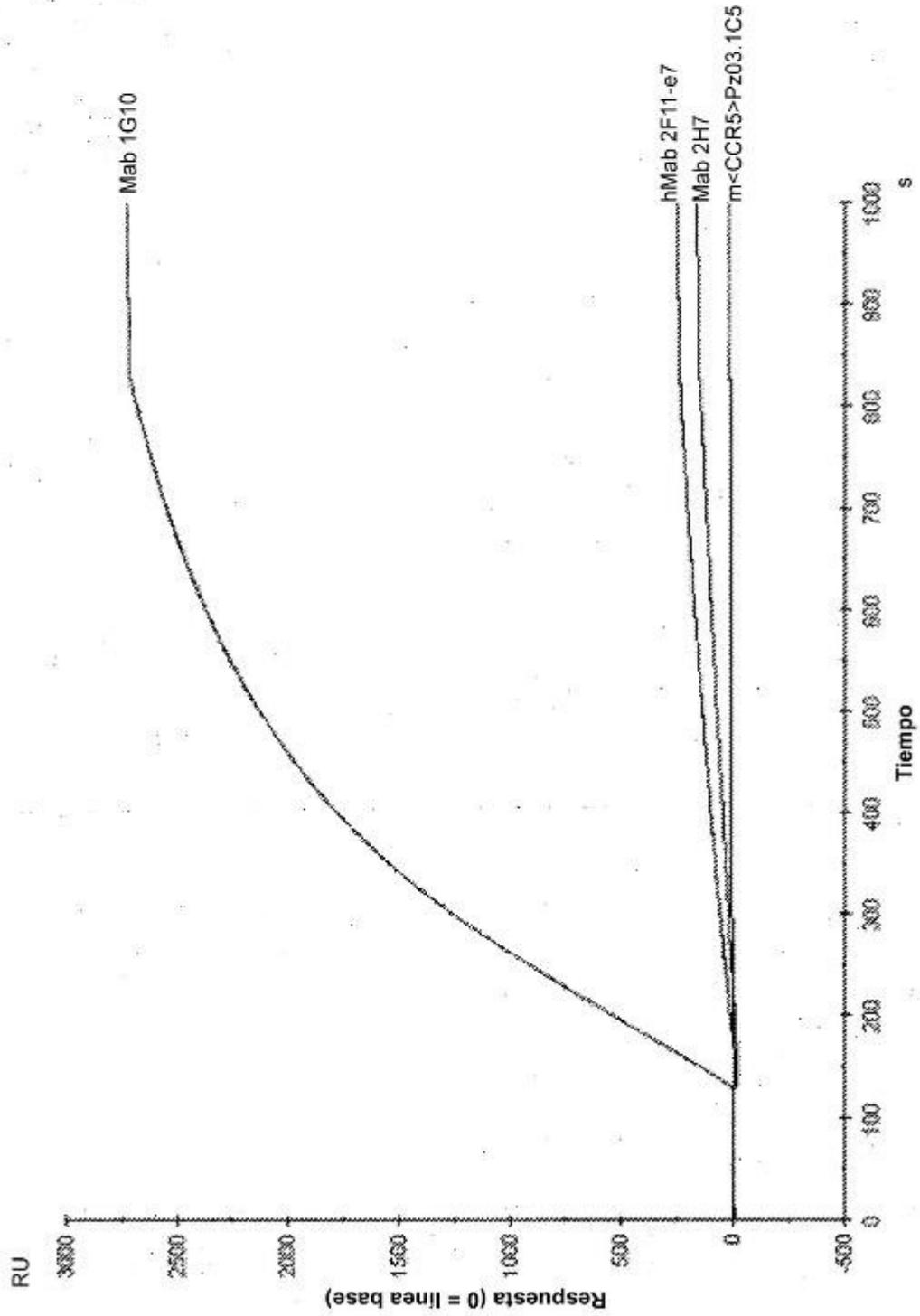
**Fig. 2b**



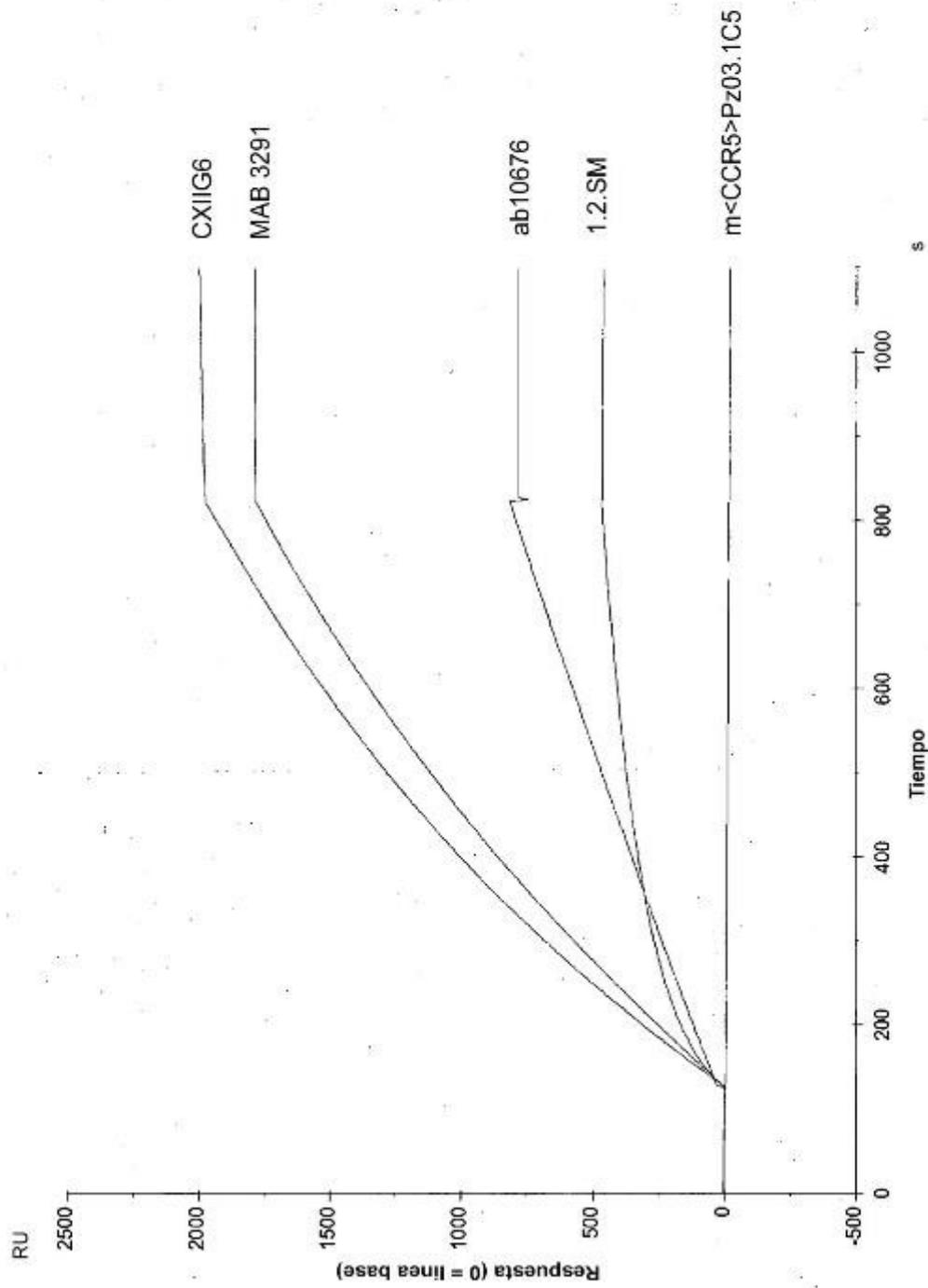
**Fig. 2c**



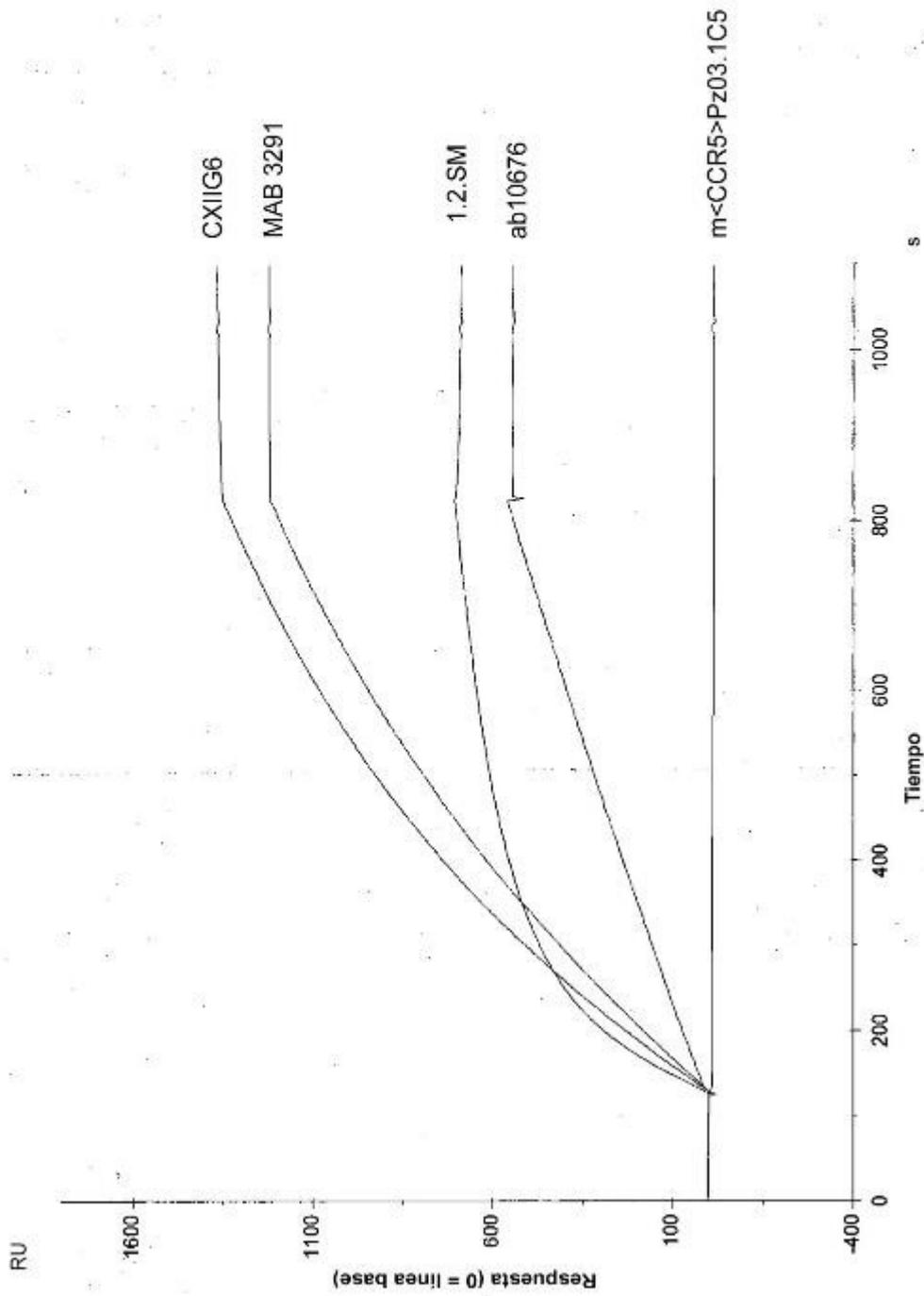
**Fig. 2d**



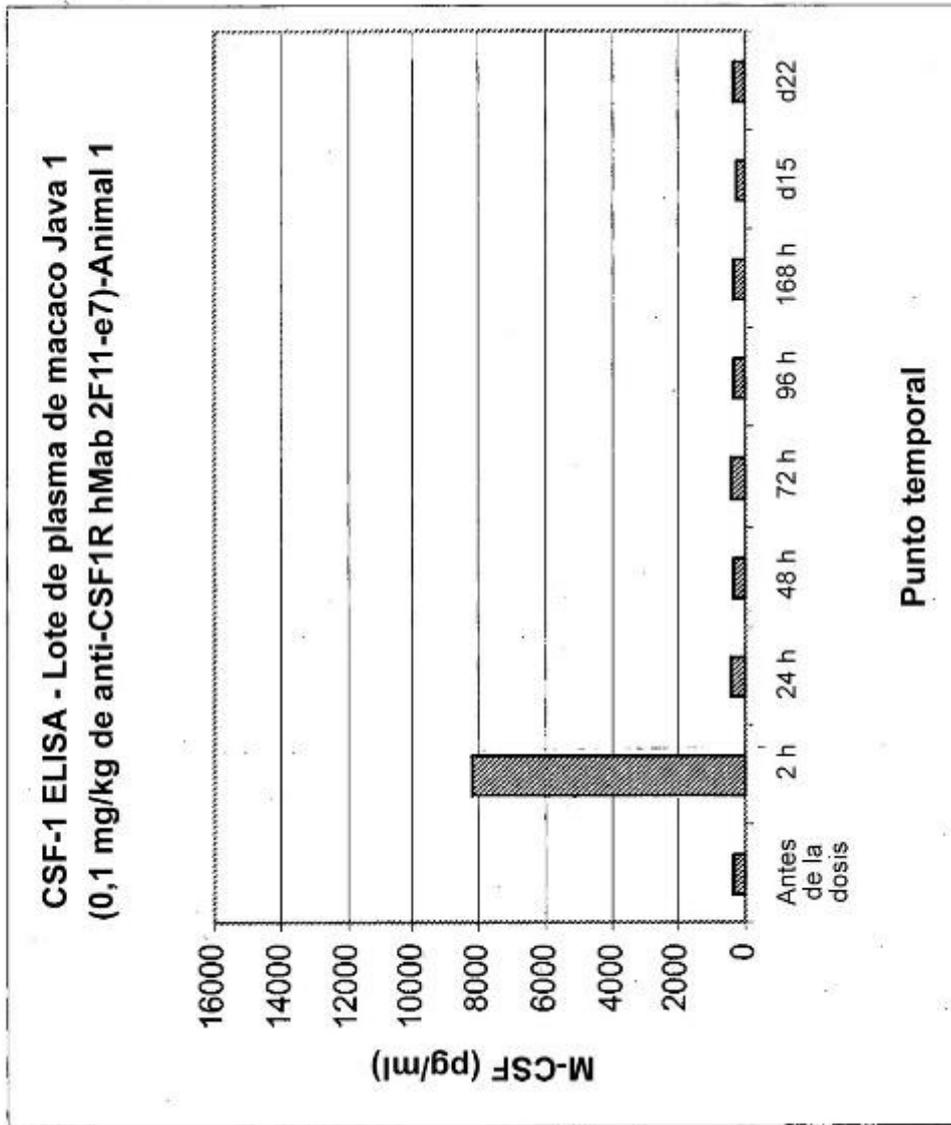
**Fig. 2e**



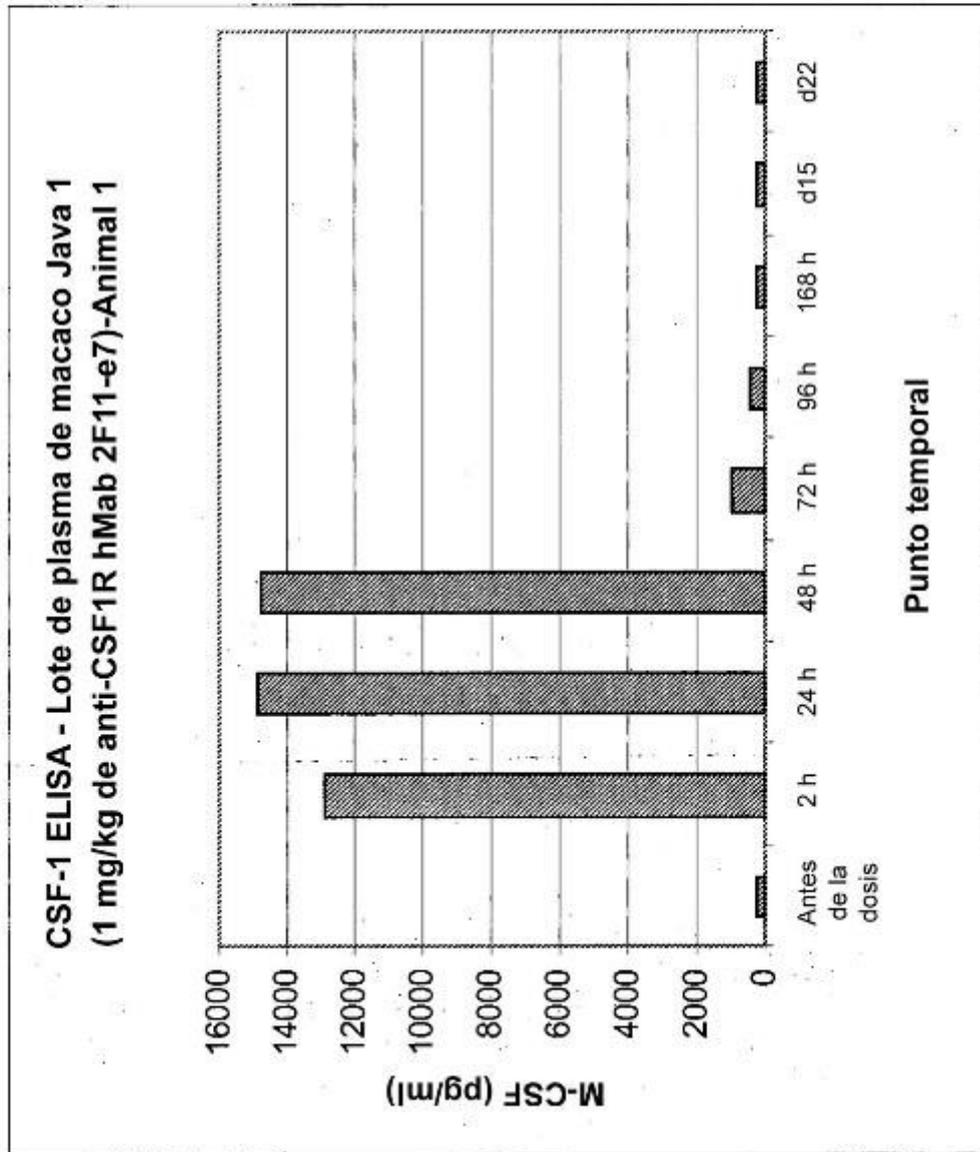
**Fig. 2f**



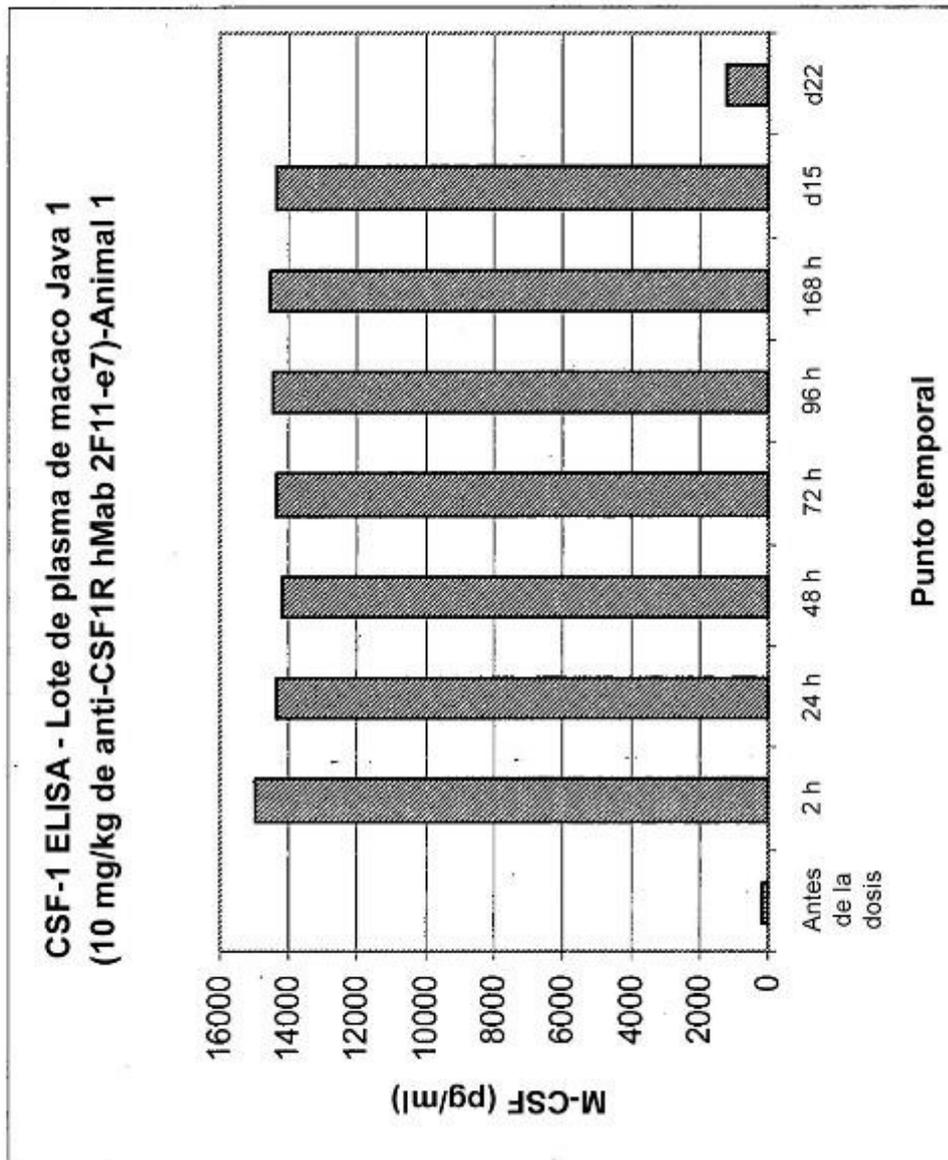
**Fig. 3a**



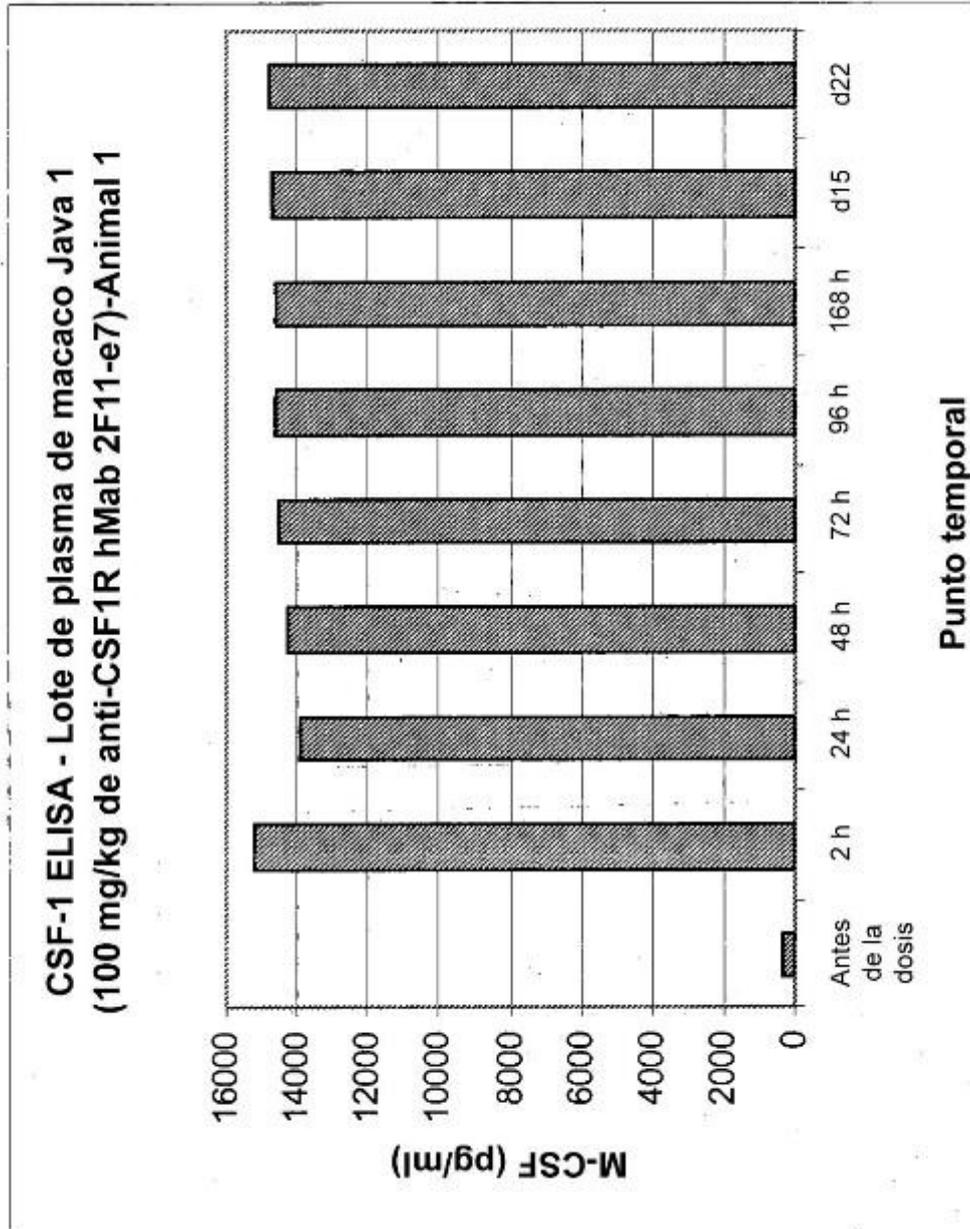
**Fig. 3b**



**Fig. 3c**



**Fig. 3d**



**Fig. 4**

