

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 735**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2014 PCT/EP2014/068050**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15028455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2014 E 14755668 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3038643**

54 Título: **Anticuerpos contra CSF-1R**

30 Prioridad:

30.08.2013 GB 201315487

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
60, Allée de la Recherche
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**CRAGGS, GRAHAM;
HERVÉ, KARINE JEANNINE MADELEINE y
MARSHALL, DIANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 735 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra CSF-1R

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CSF-1R, ADN que codifica el mismo, células hospedadoras que comprenden dicho ADN y métodos de expresión del anticuerpo en una célula hospedadora. La invención también se extiende a composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo del mismo y el uso del anticuerpo, y composiciones que comprenden el mismo en el tratamiento.

El factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es una citoquina producida por una variedad de células, incluyendo macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. El CSF-1 está compuesto de dos polipéptidos "monómeros", que forman una proteína CSF-1 dimérica biológicamente activa. El CSF-1 existe en al menos tres formas maduras debido al proceso de corte y empalme alternativo de ARN (véase, Cerretti et al., 1988, Molecular Immunology, 25: 761). Las tres formas de CSF-1 se traducen a partir de diferentes precursores de ARNm, que codifican monómeros polipeptídicos de 256 a 554 aminoácidos, que tienen una secuencia señal de 32 aminoácidos en el extremo amino terminal y una presunta región transmembranal de aproximadamente 23 aminoácidos cerca del extremo carboxilo terminal. Luego los péptidos precursores se procesan mediante escisiones proteolíticas en los extremos amino y carboxilo terminales para liberar el CSF-1 maduro. Los restos 1-149 de las tres formas maduras del CSF-1 son idénticos y se cree que contienen secuencias esenciales para la actividad biológica del CSF-1. Los monómeros del CSF-1 *in vivo* se glucosilan y dimerizan a través de un enlace disulfuro. El CSF-1 pertenece a un grupo de agonistas biológicos que promueven la producción de células sanguíneas. De manera específica, actúa como un factor de crecimiento y diferenciación para las células progenitoras de la médula ósea del linaje del fagocito mononuclear. Además, el CSF-1 estimula la supervivencia, proliferación y función de los macrófagos a través de un receptor específico en las células que responden.

El receptor de CSF-1 (CSF-1R) también se conoce como el producto del gen *c-fms* o CD115. El CSF-1R es una glucoproteína TM tipo 1 de 165kDa que pertenece a la familia de receptores de tirosina quinasa tipo III. Además del CSF-1, también se ha demostrado que la molécula IL-34, estructuralmente similar, pero no relacionada en cuanto a su secuencia, es un ligando para CSF-1R (Lin, et al., 2008, Science 320: 807-811). La expresión del CSF-1R se restringe a las células del linaje monocito-macrófago, tanto poblaciones circulantes como residentes en un tejido, y osteoclastos. Además, se expresa en varias células del sistema reproductor femenino incluyendo ovocitos, células deciduales y trofoblastos.

La unión del ligando de CSF-1 al receptor de CSF-1 da como resultado la fosforilación del receptor en uno o más restos de tirosina, a través de la acción del dominio tirosina quinasa. Esta fosforilación se puede detectar gracias a que los anticuerpos están disponibles y se unen al receptor solo después de la fosforilación (por ejemplo, el anticuerpo #3083 del receptor fosfo-M-CSF (Tyr546) de Cell Signaling Technology).

La expresión de CSF-1 y CSF-1R se correlaciona con la progresión tumoral y el diagnóstico deficiente en muchos tipos de cáncer. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) pueden ser el componente principal del estroma tumoral y los altos niveles de CSF-1 y CSF-1R se asocian con altas infiltraciones de TAM y mal pronóstico en varios tipos de tumor.

Los anticuerpos frente a CSF-1R se conocen en la técnica. Sherr, C.J. et al., 1989, Blood 73:1786-1793 describen anticuerpos contra CSF-1R que inhiben la actividad del CSF-1 (Sherr, C.J. et al., 1989, Blood 73:1786-1793). El documento WO2009/026303 describe anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al CSF-1R humano y modelos de tumor de ratón *in vivo* que utilizan un anticuerpo CSF-1R anti-murino. El documento WO2011/123381 describe anticuerpos anti-CSF-1R que internalizan CSF-1R y tienen actividad ADCC. El documento WO2011/123381 también describe modelos de tumor de ratón *in vivo* que utilizan un anticuerpo CSF-1R anti-murino. El documento WO2011/140249 describe anticuerpos anti-CSF-1R que bloquean la unión del CSF-1 a CSF-1R y se consideran útiles en el tratamiento del cáncer. El documento WO2009/112245 describe un anticuerpo IgG1 anti-CSF-1R que inhibe la unión del CSF-1 a CSF-1R y se considera útil en el tratamiento del cáncer, la enfermedad inflamatoria del intestino y la artritis reumatoide. El documento WO2011/131407 describe un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la unión del CSF-1 a CSF-1R y se considera útil en el tratamiento de la pérdida ósea y el cáncer. El documento WO2011/107553 describe un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la unión del CSF-1 a CSF-1R que se cree que es útil en el tratamiento de la pérdida ósea y el cáncer. El documento WO2011/070024 describe anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al fragmento delD4 de CSF-1R humano.

Existe una necesidad en la técnica de proporcionar nuevos anticuerpos anti-CSF-1R adecuados para aplicaciones terapéuticas. Pese a que la aplicación terapéutica de los anticuerpos anti-CSF-1R en el tratamiento de ciertos cánceres se ha descrito anteriormente, todavía existe la necesidad de proporcionar nuevas aplicaciones terapéuticas para tales anticuerpos.

El término "enfermedad fibrótica" se refiere a una respuesta de cicatrización aberrante en la que se forma exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. La deposición y acumulación en exceso de componentes de la matriz extracelular, tales como colágeno y fibronectina, da como resultado el endurecimiento y fibrosis de los tejidos que finalmente puede llevar a fallo orgánico.

Los ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen fibrosis pulmonar, tales como fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística, fibrosis renal, fibrosis hepática, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloides, infarto del miocardio, esclerosis sistémica, escleroderma y artrofibrosis.

La laceración da como resultado una respuesta inmediata de coagulación y formación de coágulo con el desarrollo de una matriz extracelular (ECM) provisional. La agregación y activación plaquetaria ayuda a promover una respuesta inflamatoria caracterizada por vasodilatación y aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos que permite el reclutamiento de una variedad de células inmunes incluyendo neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos. Los neutrófilos y macrófagos desbridan la herida reduciendo así el riesgo de infección y junto con los linfocitos activados, secretan una variedad de factores de crecimiento y citoquinas que sirven para amplificar más la respuesta inmunitaria. Las moléculas tales como TGF β , PDGF, IL-13 activan los macrófagos y conducen al reclutamiento, la proliferación y la activación de fibroblastos en el sitio de la herida. Los fibroblastos o miofibroblastos activados se caracterizan por la expresión de la α -actina de músculo liso y secretan colágeno y otros componentes de la ECM. Los fibroblastos activados contraen el entramado de colágeno, tirando de los bordes de la herida hacia el centro. Las células epiteliales y endoteliales proliferan y migran sobre la matriz temporal para regenerar el tejido dañado, completando la reparación de la herida.

El daño o lesión tisular persistente o una mala regulación de la ruta de reparación llevan a una respuesta inapropiada de la herida. Se presenta un depósito excesivo e hiper-entrecruzamiento del colágeno y de la ECM, lo que da como resultado la formación excesiva y endurecimiento del tejido cicatricial en lugar de la arquitectura del tejido normal.

La causa de la enfermedad fibrótica puede depender del órgano o tejido involucrado y se desconoce en algunas enfermedades tales como la fibrosis pulmonar idiopática (IPF). La fibrosis hepática y finalmente la cirrosis son el resultado de un daño hepático crónico sostenido a través de la exposición a una variedad de factores, incluyendo factores medioambientales y dietéticos o agentes infecciosos. Las infecciones de larga duración como la hepatitis B y C pueden ocasionar fibrosis hepática. El consumo excesivo de alcohol sostenido en el tiempo o una dieta alta en grasa/azúcar también puede producir cirrosis del hígado. De manera similar, la diabetes puede dañar y lesionar los riñones conduciendo a la pérdida de la función.

El IPF es una de siete enfermedades pulmonares intersticiales cuya causa se desconoce. Los factores medioambientales tales como la exposición a la radiación o las partículas pueden desempeñar un papel. Los individuos que fuman también tienen mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad. Una vez diagnosticada, la expectativa de vida de los pacientes es muy corta con una tasa promedio de supervivencia de 2-5 años.

El tratamiento de la enfermedad fibrótica típicamente incluye agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores, pero estos son de poco beneficio para el paciente. La falta de eficacia con estos tratamientos contribuyó a la reconsideración del IPF y de la enfermedad fibrótica en general, como una respuesta aberrante a la cicatrización de la herida y no como una condición inflamatoria. La pirfenidona es un fármaco de molécula pequeña que fue aprobada para uso en el tratamiento del IPF en Japón en 2008 y en Europa en 2011, que probablemente trabaja vía múltiples mecanismos de acción. Hasta la fecha, ninguna terapia dirigida ni terapia con anticuerpos ha sido aprobada para indicaciones fibróticas.

Por lo tanto, actualmente hay una necesidad médica no satisfecha de un tratamiento mejorado de la enfermedad fibrótica. Por ejemplo, para IPF hay una tasa de supervivencia a los 3 años del 50% y una tasa de supervivencia a los 5 años de solamente el 20% y se requiere de trasplante en aproximadamente el 20% de los casos.

Sumario de la descripción

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R del mismo que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO:6 para CDR-H3, por ejemplo, en donde CDR-H1 es SEQ ID NO: 4, CDR-H2 es SEQ ID NO: 5 y CDR-H3 es SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, los anticuerpos según la presente descripción comprenden una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos uno de una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, por ejemplo, en donde CDR-L1 es SEQ ID NO: 1, CDR-L2 es SEQ ID NO: 2 y CDR-L3 es SEQ ID NO: 3.

Los anticuerpos de la descripción tienen una alta afinidad por CSF-1R, son capaces de bloquear la unión del ligando al CSF-1R, no son activantes para CSF-1R y no causan la internalización del CSF-1R.

La descripción también se extiende a un polinucleótido, tal como ADN, que codifica un anticuerpo o fragmento como se describe en la presente memoria.

También se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho polinucleótido.

Los métodos para expresar un anticuerpo del mismo se proporcionan en la presente memoria.

La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos de los mismos.

- 5 En una realización, se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o composición como se describe en la presente memoria.

La presente descripción también se extiende a un anticuerpo o composición según la presente descripción para uso en un tratamiento, particularmente en el tratamiento del cáncer y/o enfermedad fibrótica.

Detalles de la descripción

- 10 En una realización, los anticuerpos proporcionados por la presente invención son capaces de bloquear la unión del ligando al CSF-1R. El bloqueo, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un bloqueo físico, tal como la oclusión del receptor, pero también incluirá el caso en que el anticuerpo se une a un epítipo que causa, por ejemplo, un cambio conformacional, lo que significa que el ligando natural no se unirá más al receptor (referido aquí como bloqueo alostérico o inhibición alostérica). En una realización, los anticuerpos de la presente descripción se unen a todos los isotipos de CSF-1R, por ejemplo, aquellos con variaciones en el dominio ECD, tales como V23G, A245S, H247P, V279M y combinaciones de dos, tres o cuatro de dichas variaciones.

- 15 Los ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear el CSF-1R se describen en los Ejemplos en la presente memoria. El CSF-1 e IL-34 son ambos ligandos para CSF-1R y los anticuerpos de la invención preferiblemente inhiben la actividad tanto del CSF-1 como de IL-34 en un tamiz celular funcional. Los anticuerpos según la presente invención preferiblemente también hacen desaparecer de manera selectiva la población no clásica de monocitos *in vivo*.

- 20 Los monocitos no clásicos, generalmente se refieren a los monocitos con baja expresión de CD14 y una alta expresión de CD16. Se cree que esta población de monocitos son precursores de los macrófagos asociados al tumor.

- 25 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una alta afinidad de unión. La afinidad se puede medir utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo técnicas tales como resonancia del plasmón superficial, por ejemplo, BIAcore, como se describe en los Ejemplos en la presente memoria, utilizando CSF-1R natural o recombinante aislado o una proteína/polipéptido de fusión adecuado. En un ejemplo, la afinidad se mide utilizando el dominio extracelular del CSF-1R recombinante humano como se describe en los Ejemplos en la presente memoria. En un ejemplo, el dominio extracelular del CSF-1R recombinante humano utilizado es un monómero. De manera adecuada, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión por CSF-1R humano aislado de aproximadamente 1 nM o menos de 1 nM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 500 pM o menos. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 250 pM o menos. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 200 pM o menos. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menos. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R humanizado con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menos, preferiblemente de aproximadamente 10 pM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 5 pM o menos. En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R humanizado con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menos, preferiblemente de aproximadamente 10 pM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 5 pM o menos.

Cuanto menor sea el valor numérico de la afinidad, mayor será la afinidad del anticuerpo o fragmento por el antígeno.

- 45 El CSF-1R humano, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a la proteína humana de nombre CSF-1R o a un fragmento biológico activo del mismo, por ejemplo, como se indica en la SEQ ID NO: 39 o registrado en UniProt con el número P07333. Por supuesto, la proteína madura expresada no comprende la secuencia señal porque esta última se escinde después de la traducción.

- 50 Los presentes inventores han proporcionado nuevos anticuerpos anti-CSF-1R, incluyendo anticuerpos humanizados. Los anticuerpos se generaron por la inmunización de ratas con fibroblastos de rata que se transfectaron con un vector que expresa el dominio extracelular de CSF-1R. La selección primaria de los sobrenadantes para la unión del anticuerpo a CSF-1R humano identificó aproximadamente 1000 pocillos que contenían anticuerpos con actividad anti-CSF-1R. La selección secundaria para los anticuerpos capaces de prevenir la unión del CSF-1 humano al CSF-1R humano identificó 88 pocillos positivos. La selección terciaria para anticuerpos capaces de prevenir la supervivencia dependiente de CSF-1 de los monocitos humanos primarios identificó 18 pocillos positivos. Las regiones variables de estos 18 pocillos positivos se clonaron, lo que condujo a la clonación exitosa de 14 anticuerpos y la subsecuente expresión proporcionó 9 anticuerpos quiméricos anti-CSF-1R que se expresaron a niveles suficientes y fueron capaces de inhibir la unión de CSF-1. Estos 9 anticuerpos se secuenciaron y se encontró que todos tienen secuencias únicas.

y se utilizaron para un estudio adicional.

Los 9 anticuerpos quiméricos anti-CSF-1R se evaluaron para determinar la actividad de bloqueo de ligando y la capacidad de inhibir la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 e IL-34. Se priorizó la investigación adicional de cuatro de los anticuerpos porque demostraron una inhibición completa de la unión de CSF-1 y altos niveles de inhibición de la supervivencia de los monocitos. Estos 4 anticuerpos quiméricos anti-CSF-1R se probaron para determinar su actividad en una serie de ensayos *in vitro* para evaluar la afinidad, la inhibición de la unión de CSF-1, la reactividad cruzada con CSF-1R del mono rhesus, de mono cinomolgo y de cánido, la interiorización de CSF-1R y la activación de CSF-1R. Los cuatro anticuerpos anti-CSF-1R también eran humanizados y se midió la afinidad de los injertos humanizados. La humanización de dos de los anticuerpos anti-CSF-1R generó anticuerpos completamente humanizados (sin restos presentes del donante de rata) con afinidad (K_D) equivalente al anticuerpo quimérico parental y una T_m que indica que el anticuerpo tiene una estabilidad térmica adecuada. En cambio, los otros dos anticuerpos anti-CSF-1R humanizados tenían una afinidad reducida por CSF-1R, en relación con el anticuerpo quimérico, y la T_m fue menor. Por estas razones, solo los injertos completamente humanizados de dos de los anticuerpos que retuvieron la afinidad se expresaron a mayor escala para su posterior análisis.

Se llevó a cabo un análisis adicional de los injertos completamente humanizados de estos dos anticuerpos y un ensayo de inhibición de MCP-1, donde la inhibición de la señalización de CSF-1R por el anticuerpo que bloquea la unión de CSF-1 ocasionó una reducción en los niveles de secreción de MCP-1. Este ensayo reveló sorprendentemente que los injertos completamente humanizados exhibían una menor actividad en comparación con el anticuerpo quimérico. Se llevaron a cabo una serie de experimentos con uno de los anticuerpos preferidos, denominado Ab969, para revelar por qué el injerto completamente humanizado exhibió esta menor actividad. Se generaron una serie de injertos humanizados intermedios de Ab969 y se probaron en el ensayo de inhibición de MCP-1. Se encontró que los injertos que contenían el resto Y71 de la cadena ligera variable del donante generalmente mostraban una actividad en el ensayo de inhibición de MCP-1 comparable a la del Ab969 quimérico. Se planteó la hipótesis de que esta diferencia en la actividad de los diversos injertos de anticuerpos en el ensayo de inhibición de MCP-1 se debía a un cambio en la tasa de activación del anticuerpo (K_a disminuida) en comparación con el Ab969 quimérico.

Comparando el análisis de estabilidad térmica de Ab969 con otros anticuerpos anti-CSF-1R, por ejemplo, el anticuerpo anti-CSF-1R Ab970, se sugiere que el Ab969 puede ser más estable.

Un análisis biofísico adicional de los injertos humanizados de Ab969 reveló que algunos injertos se precipitaron cuando se concentró el anticuerpo. Se demostró que una sustitución del resto de lisina en la posición 38 en la cadena ligera, por ejemplo, glutamina, conduce a una estabilidad física mejorada.

Por consiguiente, se seleccionó un injerto de anticuerpo de Ab969, Ab969.g2 (también denominado Ab969) para estudios adicionales de caracterización *in vitro*. Además de la ventajosa afinidad de unión al CSF-1R, alta estabilidad térmica y alta estabilidad física, el anticuerpo demostró una buena inhibición de la activación de monocitos dependiente de IL-34 y también se encontró que era capaz de unirse a las variantes SNP del CSF-1R. También se utilizó Ab969.g2 para el análisis de marcadores farmacodinámicos en un mono cinomolgo donde se demostró que se une al CSF-1R, bloquea la unión de CSF-1 y hace desaparecer de manera selectiva la población no clásica de monocitos de mono cinomolgo *in vivo*, que son células precursoras de macrófagos asociados a tumores.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera, en donde la cadena pesada y/o la cadena ligera comprenden al menos una CDR derivada del anticuerpo anti-CSF-1R 969.2.

Ab969.2 es una molécula de IgG4 humanizada de longitud completa; la cadena ligera comprende una región constante de la cadena kappa humana (alotipo Km3) y la cadena pesada comprende una región constante de la cadena pesada gamma-4 humana con la mutación estabilizante de la bisagra S241P (Angal *et al.*, 1993). Un motivo de isomerización DG potencial está presente dentro de la región variable de la cadena ligera en la unión de CDR-L2 con el marco. Las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo Ab969.2 completo se muestran en SEQ ID NOs: 27 y 19.

Los restos en los dominios variables del anticuerpo se numeran convencionalmente según un sistema diseñado por Kabat *et al.*, 1987. Este sistema se describe en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (En adelante, "Kabat *et al.* (*supra*)"). Este sistema de numeración se utiliza en la presente memoria descriptiva, salvo que se indique lo contrario.

Las designaciones de restos Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos que en la numeración Kabat estricta que corresponde a un acortamiento de, o una inserción en, un componente estructural, ya sea un marco o una región determinante de complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. La numeración Kabat correcta de los restos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante el alineamiento de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "estándar".

Las CDRs del dominio variable de la cadena pesada están ubicadas en los restos 31-35 (CDR-H1), los restos 50-65 (CDR-H2) y los restos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, AM, J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el resto 26 hasta

el resto 32. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, 'CDR-H1', tal como se emplea en la presente memoria, pretende referirse a los restos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración Kabat y la definición del bucle topológico de Chothia.

5 Las CDRs del dominio variable de la cadena ligera están ubicadas en los restos 24-34 (CDR-L1), los restos 50-56 (CDR-L2) y los restos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración Kabat.

10 Los anticuerpos para uso en la presente descripción se pueden obtener utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El polipéptido/proteína CSF-1R que incluye proteínas de fusión, células (recombinantes o naturales) que expresan el polipéptido se puede utilizar para producir anticuerpos que reconocen específicamente el CSF-1R. El polipéptido puede ser el polipéptido "maduro" o un fragmento o derivado biológicamente activo del mismo. La proteína humana está registrada en UniProt con el número P07333.

15 Los polipéptidos, para utilizar en la inmunización de un huésped, se pueden preparar mediante procesos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedadoras genéticamente modificadas que comprenden sistemas de expresión o se pueden recuperar de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se utilizan indistintamente a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido CSF-1R en algunos casos puede ser parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a una etiqueta de afinidad o similar.

20 Se pueden obtener los anticuerpos generados contra el polipéptido CSF-1R, cuando sea necesaria la inmunización de un animal, mediante la administración de los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, utilizando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase, por ejemplo, el Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Se pueden inmunizar muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas generalmente son los más adecuados.

25 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, tales como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de hibridoma-EBV (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc.).

30 Los anticuerpos también se pueden generar utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y expresión de ADNc de región variable de inmunoglobulina generados de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848; el documento WO92/02551; el documento WO04/051268 y la Solicitud de Patente Internacional número WO04/106377.

La selección de anticuerpos se puede realizar utilizando ensayos para medir la unión a CSF-1R humano y/o los ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión del ligando al receptor. Los ejemplos de ensayos adecuados se describen en los Ejemplos de la presente memoria.

35 Específico, tal como se emplea en la presente memoria, pretende referirse a un anticuerpo que solo reconoce el antígeno para el que es específico o un anticuerpo que tiene una afinidad de unión significativamente mayor con respecto al antígeno para el que es específico en comparación con la unión a los antígenos a los que no es específico, por ejemplo, afinidad de unión al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor.

40 Las secuencias de aminoácidos y de polinucleótidos de ciertos anticuerpos según la presente descripción se proporcionan en las Figuras 1 y 2.

45 En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de: una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 6 para CDR-H3. Preferiblemente, el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

50 En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de: una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3. Preferiblemente, el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

55 En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que comprende una cadena pesada como se definió anteriormente y que además comprende una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de: una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia

dada en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3. Preferiblemente, el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3.

5 En la presente memoria se describe una realización, en la que al menos un aminoácido se reemplaza con una sustitución conservadora en una o más CDRs seleccionadas del grupo que consiste independientemente de:

cualquiera de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3;

cualquiera de las combinaciones CDR-H1 y H2, CDR-H1 y H3, CDR-H1 y L1, CDR-H1 y L2, CDR-H1 y L3, CDR-H2 y H3, CDR-H2 y L1, CDR-H2 y L2, CDR-H2 y L3, CDR-H3 y L1, CDR-H3 y L2, CDR-H3 y L3, CDR-L1 y L2, CDR-L1 y L3, CDR-L2 y L3;

10 CDR-H1, H2 y H3, CDR-H1, H2 y L1, CDR-H1, H2 y L2, CDR-H1, H2 y L3, CDR-H2, H3 y L1, CDR-H2, H3 y L2, CDR-H2, H3 y L3, CDR-H3, L1 y L2, CDR-H3, L1 y L3, CDR-L1, L2, L3;

cualquiera de las combinaciones CDR-H1, H2, H3 y L1, CDR-H1, H2, H3 y L2, CDR-H1, H2, H3 y L3, CDR-H2, H3, L1 y L2, CDR-H2, H3, L2 y L3, CDR-H3, L1, L2 y L3, CDR-L1, L2, L3 y H1, CDR-L1, L2, L3 y H2, CDR-L1, L2, L3 y H3, CDR-L2, L3, H1 y H2,

15 CDR-H1, H2, H3, L1 y L2, CDR-H1, H2, H3, L1 y L3, CDR-H1, H2, H3, L2 y L3, CDR-L1, L2, L3, H1 y H2, CDR-L1, L2, L3, H1 y H3, CDR-L1, L2, L3, H2 y H3; y

la combinación CDR-H1, H2, H3, L1, L2 y L3.

20 En la presente memoria se describe una realización, en donde un dominio de la cadena pesada descrita en la presente memoria incluye la secuencia con 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ejemplo, en donde las sustituciones se encuentran en el marco.

En la presente memoria se describe una realización, en donde el marco de la región variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos que se han insertado, eliminado, sustituido o una combinación de los mismos. En una realización, el aminoácido sustituido es uno que corresponde a un aminoácido del anticuerpo donante.

25 En la presente memoria se describe una realización, en donde una región variable ligera descrita en la presente memoria incluye la secuencia con 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos conservadoras, por ejemplo, en donde las sustituciones se encuentran en el marco.

En la presente memoria se describe una realización, en donde el marco de la región variable de la cadena ligera comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos que se han insertado, eliminado, sustituido o una combinación de los mismos. En una realización, el aminoácido sustituido es uno que corresponde a un aminoácido del anticuerpo donante.

30 En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDRs y la secuencia de CDR-H1 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 4, la secuencia de CDR-H2 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 5 y la secuencia de CDR-H3 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 6.

35 Preferiblemente, el anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo, comprende además una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDRs y la secuencia de CDR-L1 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 1, la secuencia de CDR-L2 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 y la secuencia de CDR-L3 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 3.

40 En la presente memoria se describen regiones variables proporcionadas con al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con una secuencia de la región variable descrita en la presente memoria. En otra realización, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R que compite con la unión de un anticuerpo o fragmento de la invención para unirse al receptor CSF-1R, preferiblemente al dominio extracelular del receptor CSF-1R, más específicamente al receptor CSF-1R de SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38 y/o 39 o la secuencia en la base de datos UniProt entrada P07333, en particular al dominio extracelular del receptor CSF-1R de SEQ ID NO: 36 o los 498 aminoácidos del dominio extracelular descrito en la base de datos UniProt entrada P07333 (aminoácido 20 a 517 de P07333).

45 En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R que bloquea de manera cruzada la unión de un anticuerpo que comprende las 6 CDRs dadas en la secuencia SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2, SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, por ejemplo, con afinidad de 100 pM o menos, en particular en donde el bloqueo de manera cruzada es alostérico.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que inhibe o se superpone con la unión de CSF-1 y/o IL-34 al dominio extracelular del receptor CSF-1R.

En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R que bloquea de manera cruzada la unión de un

anticuerpo que comprende las 6 CDRs dadas en la secuencia SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2, SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, por ejemplo con una afinidad de 100 pM o menos, en particular en donde el anticuerpo bloquea de manera cruzada la unión mediante la unión al mismo epítipo que el anticuerpo que lo bloquea.

- 5 En la presente memoria se describe el anticuerpo o fragmento de unión del mismo en donde se escinde un resto C-terminal de la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, el resto C-terminal de una secuencia de cadena pesada, por ejemplo, una lisina terminal. En una realización el aminoácido se escinde de una secuencia descrita en la presente memoria. Generalmente, la escisión es resultado de las modificaciones pos-traduccionales del anticuerpo o fragmento de unión expresado.
- 10 En la presente memoria se describe un anticuerpo anti-CSF-1R de cualquiera de las realizaciones mencionadas más atrás o más adelante en esta memoria en donde la lisina C-terminal de la secuencia de cadena pesada dada en la SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 29 está ausente o ha sido eliminada. La lisina C-terminal ausente o eliminada, por ejemplo, en la posición 453 de SEQ ID NO: 27 o en la posición 472 de SEQ ID NO: 30 se puede conseguir, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo anti-CSF-1R en un sistema de expresión sin codificar la lisina terminal. De manera alternativa, la eliminación de un resto C-terminal, tal como lisina, se puede llevar a cabo como una modificación pos-traduccional.
- 15

En una realización, el anticuerpo según la invención está humanizado.

- Como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo o molécula de anticuerpo en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (incluyendo, si se desea, una o más CDRs modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertado en un marco de la región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano) (véase, por ejemplo, el documento US 5,585,089; WO91/09967). Para una revisión, véase Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una realización, en lugar de transferir toda la CDR, solamente se transfieren uno o más de los restos determinantes de especificidad de cualquiera de las CDRs anteriormente descritas en la presente memoria al marco del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36:25-34). En una realización, solamente se transfieren los restos determinantes de especificidad de una o más de las CDRs anteriormente descritas en la presente memoria al marco del anticuerpo humano. En otra realización, solamente se transfieren los restos determinantes de especificidad de cada una de las CDRs anteriormente descritas en la presente memoria al marco del anticuerpo humano. Cuando se injertan las CDRs o los restos determinantes de especificidad, se puede utilizar cualquier secuencia apropiada del marco de la región variable del aceptor respecto a la clase/tipo del anticuerpo donante del que se derivan las CDRs, incluyendo regiones marco de ratón, primate y ser humano.
- 20
- 25
- 30

- De manera adecuada, el anticuerpo humanizado según la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones marco del aceptor humano, así como una o más de las CDRs específicamente proporcionadas en la presente memoria. Por lo tanto, en una realización se proporciona un anticuerpo humanizado que se une al CSF-1R humano en donde el dominio variable comprende las regiones marco del aceptor humano y las CDRs donantes no de ser humano.
- 35

- Los ejemplos de marcos de ser humano que se pueden utilizar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden utilizar para la cadena pesada, REI se puede utilizar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden utilizar para ambas, la cadena pesada y la cadena ligera. De manera alternativa, se pueden utilizar las secuencias de línea germinal humana; estas se encuentran disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>
- 40

También se describe un anticuerpo humanizado en donde, las cadenasceptoras pesadas y ligeras no necesariamente necesitan derivarse del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tienen regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

- 45 También se describe un marco humano que comprende 1, 2, 3 o 4 sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservativas o sustituciones de restos donantes.

También se describe la secuencia empleada como un marco humano que es 80%, 85%, 90%, 95% o más similar o idéntica a una secuencia descrita en la presente memoria.

- Una de dichas regiones marco adecuadas para la cadena pesada del anticuerpo humanizado de la presente invención se deriva de la secuencia 3-1 2-70 del subgrupo humano VH2 junto con la región J de JH3 (SEQ ID NO: 33).
- 50

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 6 para CDR-H3, en donde la región marco de cadena pesada se deriva de la secuencia 1-3 3-07 del subgrupo humano VH3 junto con JH4.

- 55 En un ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 23.

Una región marco adecuada para la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la presente invención se deriva del subgrupo de línea germinal humana VK1 2-1-(1) 012 junto con la región J de JK4 (SEQ ID NO: 31).

5 Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, la secuencia dada en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y la secuencia dada en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, en donde la región marco de cadena ligera se deriva del subgrupo humano VK1 2-1-(1) 012 más la región J de JK4.

En un ejemplo, el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 15.

10 En un anticuerpo humanizado, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los restos inusuales se pueden cambiar por los restos que se presentan de manera más frecuente para esa clase o tipo de cadena del aceptor. Alternativamente, los restos seleccionados en las regiones marco del aceptor se pueden cambiar, de manera que correspondan al resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann et al., 1998, Nature, 332:323-324). Tales cambios se deben mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En el documento WO91/09967 se establece un protocolo para seleccionar los restos en las regiones marco del aceptor, que pueden necesitar ser cambiadas.

15 Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde al menos el resto en la posición 78 del dominio variable de la cadena pesada (numeración Kabat) es un resto donante. En una realización, el resto 78 del dominio variable de la cadena pesada se reemplaza con alanina.

20 El resto donante como se emplea en la presente memoria se refiere a un resto del anticuerpo no humano (por ejemplo, anticuerpo murino) que donó las CDRs.

En una realización, se proporciona un anticuerpo humanizado en donde el dominio variable de la cadena pesada no contiene ningún resto donante.

25 Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde al menos uno de los restos en las posiciones 38, 71 y 87 del dominio variable de la cadena ligera (numeración Kabat) son restos donantes. En una realización, uno de los restos seleccionados de los restos en las posiciones 38, 71 y 87 del dominio variable de la cadena ligera (numeración Kabat) es un resto donante. En una realización, dos de los restos seleccionados de los restos en las posiciones 38, 71 y 87, por ejemplo 38 y 71; o 38 y 87; o 71 y 87, del dominio variable de la cadena ligera (numeración Kabat) son restos donantes. En una realización, los tres restos en las posiciones 38, 71 y 87 del dominio variable de la cadena ligera (numeración Kabat) son restos donantes.

30 Se describe el resto 38 del dominio variable de la cadena ligera reemplazado con lisina. Como alternativa, el resto 38 del dominio variable de la cadena ligera se reemplaza con glutamina.

Se describe una realización en donde el resto 71 del dominio variable de la cadena ligera se reemplaza con tirosina.

Se describe una realización en donde el resto 87 del dominio variable de la cadena ligera se reemplaza con fenilalanina.

35 Se describe un anticuerpo humanizado en donde solamente el resto 71 de la región variable de la cadena ligera es un resto donante, preferiblemente tirosina.

También se describe un anticuerpo o un fragmento de unión anti-CSF-1R que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia del dominio variable de la cadena pesada dada en SEQ ID NO: 23 y una cadena ligera que comprende la secuencia del dominio variable de la cadena ligera dada en SEQ ID NO: 15.

40 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R del mismo que se une a CSF-1R, preferiblemente al dominio extracelular de CSF-1R, más preferiblemente al dominio extracelular del CSF-1R humano, en donde el anticuerpo comprende el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 23, preferiblemente en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, es un anticuerpo del tipo IgG1, IgG2, IgG4, es un Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio sencillo (por ejemplo VH o VL o VHH), scFv, anticuerpo bi, tri o tetra-valente, Bis-scFv, dianticuerpo, trianticuerpo o tetranticuerpo.

También se describe una secuencia de anticuerpo que es 80% similar o idéntica a una secuencia descrita en la presente memoria, por ejemplo 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% en parte o en toda la secuencia relevante. En una realización, la secuencia relevante es SEQ ID NO: 15. En una realización, la secuencia relevante es SEQ ID NO: 23.

50 "Identidad", como se utiliza en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se utiliza en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede cambiarse a isoleucina o valina. Otros aminoácidos que frecuentemente se pueden intercambiar incluyen, pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amina); y

5 - cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, el software BLAST™ disponible de NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. y States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Maden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656).

10 Se describen en la presente memoria las moléculas de anticuerpo que pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa total o un fragmento de unión del mismo y pueden ser, pero no se limitan a Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de un solo dominio (por ejemplo VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetra-valentes, Bis-scFv, dianticuerpos, trianticuerpos, tetranticuerpos y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores (véase por ejemplo Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews – Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181). Otros fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patentes internacionales WO05/003169, WO05/003170 y WO05/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender especificidades múltiples, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase por ejemplo los documentos WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

15 El fragmento de unión de un anticuerpo, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un fragmento capaz de unirse a un antígeno con afinidad para caracterizar el fragmento como específico para el antígeno.

20 Se describe en la presente memoria un anticuerpo según la presente descripción proporcionado como una proteína de fusión del anticuerpo de unión a CSF-1R que comprende una porción de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de domino sencillo (dAb) asociados directamente o indirectamente a la misma, por ejemplo, como se describe en los documentos WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y WO2011/086091.

25 Se describen proteínas de fusión que comprenden anticuerpos con dos dominios, por ejemplo, como un par de dominio variable de cadena pesada (VH) y dominio variable de cadena ligera (VL), opcionalmente unidos por un enlace disulfuro.

30 Se describe el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión que tiene la misma especificidad o una especificidad similar con respecto al anticuerpo o anticuerpos de un solo dominio. En una realización, el Fab o Fab' tiene una diferente especificidad con respecto al anticuerpo o anticuerpos de un solo dominio, es decir que la proteína de fusión es multivalente. En una realización, una proteína de fusión multivalente según la presente invención tiene un sitio de unión a albúmina, por ejemplo, un par VH/VL de la misma proporciona un sitio de unión a albúmina.

35 Se describen los dominios de la región constante de la molécula del anticuerpo, que se pueden seleccionar teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula del anticuerpo, y en particular de las funciones efectoras que pueden ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser los dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM de humano. En particular, se pueden utilizar los dominios de la región constante de la IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando las moléculas de anticuerpo van a ser necesarias para usos terapéuticos y no se necesitan las funciones efectoras del anticuerpo. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 se pueden utilizar cuando la molécula de anticuerpo se requiera para propósitos terapéuticos y no se requieren de funciones efectoras del anticuerpo.

40 Se describe un anticuerpo que es un anticuerpo IgG2 o IgG4.

45 Se apreciará que también se pueden utilizar las variantes de la secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, se pueden utilizar las moléculas IgG4 en las que la serina en posición 241 ha cambiado a prolina como se describió en Angal et al., 1993, Molecular Immunology, 1993, 30:105-108. Por consiguiente, en la realización en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, el anticuerpo puede incluir la mutación S241P.

50 También entenderá un experto en la técnica que los anticuerpos se pueden someter a una variedad de modificaciones pos-traduccionales. El tipo y extensión de estas modificaciones frecuentemente depende de la línea celular

hospedante, utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en la glucosilación, oxidación de la metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización del aspartato y deamidación de la asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un resto básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo puede estar ausente.

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3 y la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

Un anticuerpo proporcionado por la presente invención tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 19. También se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R en el que las cadenas pesadas y ligeras son al menos 80% (preferiblemente 85%, 90%, 95% o 98%) idénticas o similares a una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 27 y a una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 19. En una realización, la cadena ligera tiene o consiste en la secuencia dada en SEQ ID NO: 19 y la cadena pesada tiene o consiste en la secuencia dada en SEQ ID NO: 27. En otra realización, la cadena ligera tiene o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 19 y la cadena pesada tiene o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 27, en donde el aminoácido lisina en la posición 453 de SEQ ID NO: 27 está ausente o fue eliminado.

También se proporciona una región o epítipo específico del CSF-1R humano que se une por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un anticuerpo 969.g2 que comprende la secuencia gH2 (SEQ ID NO: 27) de la cadena pesada y/o la secuencia gL7 (SEQ ID NO: 19) de la cadena ligera.

Esta región o epítipo específico del polipéptido CSF-1R humano se puede identificar mediante cualquier método adecuado de mapeo del epítipo conocido en la técnica en combinación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de tales métodos incluyen selección de péptidos de longitudes variables derivados del CSF-1R para la unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que se puede unir específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo (por ejemplo, un péptido en la región de aproximadamente 5 a 20, preferiblemente de aproximadamente 7 aminoácidos en longitud). Los péptidos CSF-1R se pueden producir de manera sintética o mediante digestión proteolítica del polipéptido CSF-1R. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar, por ejemplo, por análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se puede utilizar espectroscopía de NMR o cristalografía de rayos X para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, se puede utilizar el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítipo.

Las moléculas biológicas, tales como anticuerpo o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos o básicos, dándole así a la molécula una carga neta positiva o negativa. La cantidad de carga general "observada" dependerá de la secuencia absoluta de aminoácidos de la entidad, el ambiente local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el que una superficie de la misma, accesible a la molécula o disolvente particular, no porta carga eléctrica. En un ejemplo, el anticuerpo CSF-1R y fragmentos de la invención, se pueden diseñar para que tengan un punto isoeléctrico apropiado. Esto puede conducir a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más robustas, en particular perfiles de solubilidad y/o estabilidad adecuados y/o características de purificación mejoradas.

De este modo, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo CSF-1R humanizado diseñado para tener un punto isoeléctrico diferente al del anticuerpo originalmente identificado. El anticuerpo puede, por ejemplo, diseñarse mediante la sustitución de un resto de aminoácido, tal como la sustitución de un resto de aminoácido ácido con uno o más restos de aminoácidos básicos. Alternativamente, se pueden introducir restos de aminoácidos básicos o se pueden eliminar restos de aminoácidos ácidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor de pI inaceptablemente alto, se pueden introducir restos ácidos para disminuir el pI, según se requiera. Es importante que, al manipular el pI, se debe tener la precaución de conservar la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo o fragmento diseñado tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento "no modificado".

Los programas tales como **ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html y http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html, se pueden utilizar para predecir el punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento.

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por CSF-1R. Dichas variantes se pueden obtener mediante una serie de protocolos de maduración por afinidad que incluyen la mutación de las CDRs (Yang et al., 1995, J. Mol. Biol., 254:392-403), combinación de la cadena (Marks et al., 1992,

Bio/Technology, 10:779-783), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low et al., 1996, J. Mol. Biol., 250:359-368), combinación de ADN (Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8:724-733), presentación de fagos (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., 1998, Nature, 391:288-291). Vaughan et al. (*supra*) discuten estos métodos de maduración de la afinidad.

- 5 Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención se puede conjugar con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas unidas de manera que formen una única porción que puede unirse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, este se puede preparar mediante procedimientos químicos estándar o de ADN recombinante en los que el fragmento del anticuerpo se une directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con los anticuerpos se conocen bien en la técnica (véase, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2ª ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 y WO03/031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, el enlace se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en los documentos WO86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora como se utiliza en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos reporteros, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, que destruya) las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporinas, maytansinoides, enpongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos y homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , California 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 ; o fármacos tales como, pero no limitados a, alquilfosfocolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica, tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía por emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, en general, la Patente de Estados Unidos No 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y acurina; y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semi-vida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la

inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmune. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO05/117984.

5 En una realización, es ventajosa una semi-vida proporcionada por una molécula efectora que es independiente del CSF-1R.

Cuando la molécula efectora es un polímero, puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo, un polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo o heteropolisacárido.

10 Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

Los ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

Los polímeros naturales específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

15 En una realización, el polímero es albúmina o un fragmento de la misma, tal como albúmina de suero humano o un fragmento de la misma.

20 Los "derivados", como se utilizan en la presente memoria, pretenden incluir derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos selectivos para tiol tales como maleimidias y los similares. El grupo reactivo puede estar unido al polímero de manera directa o a través de un segmento enlazador. Se apreciará que el resto de tal grupo formará en algunos casos parte del producto como el grupo de enlace entre el fragmento del anticuerpo y el polímero.

25 El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular medio de 500Da a 50000Da, por ejemplo, de 5000 a 40000Da, tal como de 20000 a 40000Da. El tamaño del polímero se puede seleccionar, en particular, en función del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizarse en ciertos tejidos tales como tumores o prolongar la semi-vida en circulación (para una revisión, véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto salga de la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo, con un peso molecular de alrededor de 5000Da. Para aplicaciones en donde el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular superior, por ejemplo, que tiene un peso molecular en el intervalo de 20000Da a 40000Da.

30 Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000Da a aproximadamente 40000Da.

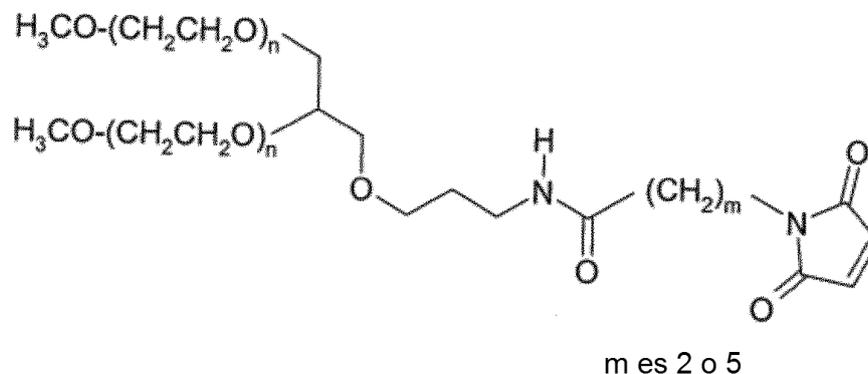
35 En un ejemplo, los anticuerpos para uso en la presente invención se unen a porciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir a través de cualquier grupo funcional de aminoácido de cadena lateral o de aminoácido terminal disponible ubicado en el fragmento del anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino libre, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Dichos aminoácidos pueden aparecer naturalmente en el fragmento del anticuerpo o se pueden modificar por ingeniería genética en el fragmento utilizando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, los documentos US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición en el extremo C-terminal de uno o más aminoácidos de cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más restos de cisteína a los que se puede unir la molécula efectora. Se pueden utilizar múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

45 Adecuadamente, las moléculas de PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un resto de cisteína localizado en el fragmento del anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado se puede unir covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína ubicado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se utiliza un grupo tiol como el punto de unión, se pueden utilizar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo, derivados selectivos de tiol tales como maleimidias y derivados de cisteína. Se puede utilizar un polímero activado como materia prima en la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contiene un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Dichas materias primas se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o se pueden preparar a partir de materias primas comercialmente disponibles utilizando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

5 Se describe un fragmento Fab modificado, fragmento Fab' o diFab que está PEGilado, es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) covalentemente unido al mismo, por ejemplo, según el método descrito en los documentos EP 0948544 o EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una
10 covalentemente unido a un solo grupo tiol en una región bisagra modificada. Un resto de lisina se puede unir covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el resto de lisina se puede unir un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20,000Da. Por lo tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40,000Da.

15 Las moléculas de PEG particulares incluyen 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilamida de lisina modificada con N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) PM 20,000), también conocida como PEG2MAL40K (que se puede obtener de Nektar, anteriormente Shearwater).

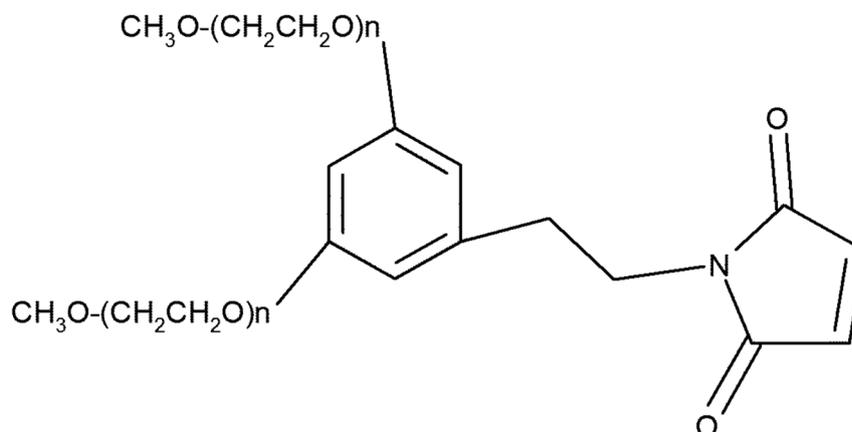
Las fuentes alternativas de enlaces PEG incluyen los NOF que suministran GL2-400MA3 (en donde m en la estructura a continuación es 5) y GL2-400MA (en donde m es 2) y n es aproximadamente 450:



Es decir, cada PEG es de aproximadamente 20,000Da.

20 Así, en una realización, el PEG es 2,3-bis(metilpolioxi-etileno-oxi)-1-[3-(6-maleimido-1-oxohexil)amino]propiloxi}hexano (el PEG ramificado con 2 grupos, $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_5-MAL$, Pm 40,000 conocido como SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Otras moléculas efectoras PEG alternativas son del siguiente tipo:



25 En una realización, se proporciona un anticuerpo, tal como un anticuerpo de longitud completa, que está PEGilado (por ejemplo, con un PEG descrito en la presente memoria), unido a través de un resto de aminoácido cisteína en o en las proximidades del aminoácido 226 en la cadena, por ejemplo, en el aminoácido 226 de la cadena pesada (mediante numeración secuencial).

30 En una realización, la presente descripción proporciona una molécula de PEG Fab' que comprende uno o más polímeros de PEG, por ejemplo 1 o 2 polímeros, tales como un polímero o polímeros de 40 kDa.

Las moléculas de Fab-PEG según la presente descripción pueden ser particularmente ventajosas porque tienen una semi-vida independiente del fragmento Fc.

En una realización, se proporciona un scFv conjugado con un polímero, tal como una molécula de PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

- 5 En una realización, el anticuerpo o fragmento se conjuga con una molécula de almidón, por ejemplo, para aumentar la semi-vida. Los métodos de conjugación comienzan con una proteína como se describió en el documento US 8,017,739.

Una molécula informadora como se emplea en la presente memoria es una molécula que se puede detectar, por ejemplo, con un colorante fluorescente, un marcador radioactivo u otra entidad detectable.

- 10 La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y ligera(s) de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

- 15 Las secuencias de ADN que codifican una molécula del anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se pueden sintetizar, según se desee, a partir de las secuencias de ADN determinadas o con base en las secuencias de aminoácidos correspondientes.

- 20 El ADN que codifica las secuencias marcoceptoras está ampliamente disponible para aquellos expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente con base en sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Se pueden utilizar técnicas estándar de biología molecular para preparar las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Las técnicas de mutagénesis dirigida y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden utilizar según sea apropiado.

- 25 En la Figura 1 se proporcionan ejemplos de secuencias de ADN adecuadas.

La presente invención también se refiere a un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. En una realización, el vector comprende las secuencias dadas en SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 20. Adecuadamente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención., preferiblemente SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 20, respectivamente, y las secuencias de señal adecuadas. En un ejemplo, el vector comprende una secuencia intergénica entre las cadenas pesada y ligera (véase el documento WO03/048208).

- 30 Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Manual Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

- 35 También se proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Se puede utilizar cualquier sistema de célula hospedadora/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden utilizar bacterias, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos o eucarióticos, por ejemplo, también se pueden utilizar sistemas de expresión de células hospedadoras de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células CHO, mieloma o hibridoma.

- 40 La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo, según la presente invención, que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteínas a partir del ADN que codifica la molécula del anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula del anticuerpo.

- 45 También se describe una molécula del anticuerpo que puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo se necesita una secuencia codificante del polipéptido de cadena pesada o cadena ligera para transfectar las células hospedadoras. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea celular se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un solo vector, el vector que incluye secuencias que codifican los polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Los anticuerpos y fragmentos según la presente descripción se expresan a buenos niveles a partir de las células

hospedadoras. Por lo tanto, las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos de unión son adecuados para la expresión a escala comercial.

5 Por lo tanto, se proporciona un proceso para cultivar una célula hospedadora y expresar un anticuerpo o fragmento del mismo, aislar este último y opcionalmente purificarlo para proporcionar un anticuerpo o fragmento aislado. En una realización, el proceso comprende además la etapa de conjugar una molécula efectora con el anticuerpo o fragmento aislado, por ejemplo, conjugarlo con un polímero PEG en particular como se describe en la presente memoria.

En una realización, se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o fragmento según la invención) que comprende llevar a cabo una cromatografía de intercambio aniónico en un modo de no unión, de tal manera que se retienen las impurezas en la columna y se eluye el anticuerpo.

10 En una realización, la purificación emplea captura por afinidad sobre la columna de CSF-1R.

En una realización, la purificación emplea azul cibacron o similar para la purificación de las moléculas de conjugado o fusión con albúmina.

Las resinas de intercambio iónico adecuadas para uso en el proceso incluyen la resina Q.FF (suministrada por GE-Healthcare). La etapa se puede realizar, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 8.

15 El proceso puede comprender además una etapa de captura inicial que emplea cromatografía de intercambio catiónico, que se lleva a cabo, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4 a 5, tal como 4,5. La cromatografía de intercambio catiónico puede, por ejemplo, emplear una resina tal como resina CaptoS o SP sefarosa FF (suministrada por GE-Healthcare). El anticuerpo o fragmento se puede eluir entonces de la resina empleando una solución de sal iónica tal como cloruro de sodio, por ejemplo, a una concentración de 200 mM.

20 Por lo tanto, la etapa o etapas de cromatografía pueden incluir una o más etapas de lavado, según sea apropiado.

El proceso de purificación también puede comprender una o más etapas de filtración, tal como una etapa de diafiltración.

25 Por lo tanto, en una realización se proporciona un anticuerpo o fragmento anti-CSF-1R purificado, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento humanizado, en particular un anticuerpo o fragmento según la invención, en forma sustancialmente purificada, en particular libre o sustancialmente libre de endotoxina y/o de proteína o ADN de célula hospedadora.

Forma purificada como se utilizó *supra* pretende referirse a al menos 90% de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p de pureza o más.

30 Sustancialmente libre de endotoxina, generalmente pretende referirse a un contenido de endotoxina de 1 EU por mg de producto anticuerpo o menos, tal como 0,5 o 0,1 EU por mg de producto.

Sustancialmente libre de proteína o ADN de la célula hospedadora, generalmente pretende referirse a un contenido de proteína y/o ADN de célula hospedadora de 400 µg por mg de producto del anticuerpo o menos tal como 100 µg por mg o menos, en particular 20 µg por mg, según sea apropiado.

35 La presente invención también proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R (o composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo) según la descripción para uso como un medicamento.

La presente invención también proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R (o composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo) según la descripción, para el tratamiento del cáncer.

40 La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-CSF-1R (o composición farmacéutica que comprende el mismo) según la descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis del cáncer.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de un sujeto humano que padece de, o que está en riesgo, de padecer cáncer, el método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CSF-1R según la descripción.

45 El anticuerpo según la descripción se puede utilizar para tratar cáncer, que se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hueso, mieloma, cáncer colorectal, leucemia, linfoma, cáncer de piel tal como melanoma, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer astrocítico, cáncer endometrial, cáncer cervical, cáncer de la vejiga, cáncer renal, cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer de la tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático y cáncer ovárico.

50 En una realización, el cáncer es cáncer que ha formado metástasis a partir de cualquiera de los cánceres antes listados, en particular el cáncer de hueso.

De manera sorprendente, hemos sido capaces de demostrar que un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la actividad de CSF-1R está activo en el tratamiento de la enfermedad fibrótica. De manera específica, hemos sido capaces de demostrar que un anticuerpo anti-CSF-1R se encuentra activo en modelos animales *in vivo* de la fibrosis pulmonar.

5 La presente invención también proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R (o composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo) según la descripción, para el tratamiento de la enfermedad fibrótica.

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo anti-CSF-1R (o composición farmacéutica que comprende el mismo) según la descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad fibrótica.

10 La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de un sujeto humano que padece o está en riesgo de padecer enfermedad fibrótica, cuyo método comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CSF-1R según la descripción.

15 En la presente solicitud, el término "enfermedad fibrótica" incluye las enfermedades que se caracterizan por una respuesta aberrante a la cicatrización de heridas en donde se forma un exceso de tejido conjuntivo fibroso en un órgano o tejido. Las enfermedades fibróticas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, fibrosis pulmonares tales como fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística, fibrosis renal incluyendo atrofia tubular y fibrosis intersticial, fibrosis hepática, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, infarto del miocardio, escleroderma, esclerosis sistémica y artrofibrosis.

20 En una realización, los anticuerpos o fragmentos según la descripción se emplean en el tratamiento o profilaxis del cáncer o de la enfermedad fibrótica.

25 El anticuerpo, según la descripción, se puede utilizar en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, como, por ejemplo, artritis inflamatoria, aterosclerosis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, espondilitis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, osteoartritis, eccema, dermatitis por contacto, psoriasis, síndrome de choque tóxico, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, asma, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, osteoporosis, restenosis, lesión de reperfusión cardíaca y renal, trombosis, glomerulonefritis, diabetes, reacción de injerto contra huésped, rechazo de aloinjerto, esclerosis múltiple, degeneración muscular, distrofia muscular, enfermedad de Alzheimer y accidente cerebrovascular.

Los anticuerpos y fragmentos según la presente descripción pueden emplearse en el tratamiento o la profilaxis.

30 La molécula de anticuerpo de la presente invención también se puede utilizar en el diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico *in vivo* y en la obtención de imágenes de estados de enfermedad que implican CSF-1R.

35 Como los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición generalmente se suministrará como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

40 La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar en combinación, por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado, con uno o más ingredientes terapéuticamente activos. Según la molécula de anticuerpo en la composición farmacéutica o de diagnóstico, se puede acompañar de otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo, los anticuerpos de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER-2), de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), o ingredientes que no son anticuerpos, tales como imatinib, dasatinib, nilotinib, basutinib, gefitinib, erlotinib, temsirolimus, vandetanib, vemurafenib, crizotinib, vorinostat, romidepsin, bortezomib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, regorafenib, carbozantinib, Perfenidona, esteroides u otras moléculas tipo fármaco, en particular moléculas tipo fármaco cuya semi-vida es independiente de la unión a CSF-1R.

El ingrediente activo tal como se emplea en la presente memoria se refiere a un ingrediente con un efecto farmacológico, tal como un efecto terapéutico, a una dosis relevante.

55 Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a

- una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana, o para mostrar un efecto terapéutico, farmacológico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, generalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede utilizar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Dicha información se puede utilizar para determinar las dosis útiles y las vías de administración en humanos.
- La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, la(s) combinación(es) de fármaco(s), sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante experimentación de rutina y está dentro del criterio del médico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como 100 mg/kg.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.
- Las dosis terapéuticas de los anticuerpos según la presente descripción no muestran efectos toxicológicos aparentes o limitados *in vivo*.
- Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente o se pueden administrar en combinación (por ejemplo, de manera simultánea, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.
- En una realización, los anticuerpos o fragmentos de unión según la presente descripción se emplean con una o más opciones de tratamiento del cáncer, tales como, por ejemplo, quimioterapia, radioterapia o cirugía. Si se administra con un quimioterapéutico, el anticuerpo se puede administrar antes o después del agente quimioterapéutico o al mismo tiempo. Los tratamientos de quimioterapia que se pueden utilizar en combinación con las proteínas de unión al antígeno que se proporcionan, incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes/que dañan el ADN (por ejemplo, carboplatina, cisplatina), antimetabolitos (por ejemplo, capecitabina, gemcitabina, 5-fluorouracilo), inhibidores mitóticos (por ejemplo, paclitaxel, vincristina).
- Los anticuerpos que se utilizarán para tratar diversas enfermedades inflamatorias se pueden utilizar solos o combinados con otros varios agentes antiinflamatorios.
- Los anticuerpos que se utilizarán para tratar diversas enfermedades fibróticas se pueden utilizar solos o combinados con otros varios agentes antifibróticos. Un ejemplo de tal agente es la perfedidona.
- La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la condición que se va a tratar, la gravedad de la presente afección y de si la molécula de anticuerpo se está utilizando de forma profiláctica o para tratar una afección existente.
- La frecuencia de la dosis dependerá de la semi-vida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semi-vida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis por día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semi-vida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días) y/o un perfil farmacodinámico (PD) de larga duración, puede ser necesario solamente administrar una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.
- Se pretende que la semi-vida, como se emplea en la presente memoria, se refiera a la duración de la molécula en circulación, por ejemplo, en suero/plasma.
- La farmacodinámica, como se emplea en la presente memoria, se refiere al perfil y, en particular, a la duración de la acción biológica de la molécula según la presente descripción.
- El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas virales inactivas.
- Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Además, en tales composiciones pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes o sustancias tamponantes del pH. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas y suspensiones, para la ingestión por parte del paciente.
- Las formas adecuadas para administración incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es

para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

- 5 Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones están adaptadas para la administración a sujetos humanos.

10 Adecuadamente, en las formulaciones según la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, si el pH de la formulación es 7, entonces puede ser apropiado un pl de 8-9 o superior. Si bien no deseamos estar limitados por la teoría se piensa que esto puede finalmente proporcionar una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

15 En un ejemplo, la formulación farmacéutica a un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 comprende: 1 a 200mg/mL de un anticuerpo según la presente descripción, 1 a 100mM de un tampón, 0,001 a 1% de un tensioactivo, a) 10 a 50mM de un estabilizante, b) 10 a 500mM de un estabilizante y 5 a 500 mM de un agente de tonicidad, o c) 5 a 500 mM de un agente de tonicidad.

20 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por varias rutas incluyendo, pero no limitadas a, rutas oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdermal, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden utilizar los hipoaerosoles para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

25 La administración directa de las composiciones generalmente se logrará mediante inyección, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscularmente, o se administra al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar dentro de una lesión. La dosis de tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

30 Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar mediante una vía que utilice el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación, pero que liberen al anticuerpo una vez que ha sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Está disponible una discusión a fondo de los vehículos farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

35 En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas incluyendo inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles medidos que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Los polvos inhalables, según la descripción, que contienen la sustancia activa, pueden consistir solamente de las sustancias activas antes mencionadas o de una mezcla de las sustancias activas antes mencionadas con excipientes fisiológicamente aceptables.

40 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Los mono- o disacáridos se utilizan de manera adecuada, particularmente se utiliza lactosa o glucosa en forma de sus hidratos, pero no de manera exclusiva.

45 Para depositarse en el pulmón, las partículas requieren un tamaño de partícula menor de 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo de 0,1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de gran importancia.

50 Los gases propelentes que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables se conocen en la técnica. Los gases propelentes adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes antes mencionados se pueden utilizar como tal o en mezclas de los mismos.

Los gases propelentes particularmente adecuados son derivados de alcano halogenado seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 13a y TG227. De los hidrocarburos halogenados antes mencionados, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos son particularmente adecuados.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizantes, agentes de superficie activa (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes se conocen en la técnica.

5 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente según la invención pueden contener hasta 5 % en peso de la sustancia activa. Los aerosoles según la invención contienen, por ejemplo, 0,002 a 5 % en peso, 0,01 a 3 % en peso, 0,015 a 2 % en peso, 0,1 a 2 % en peso, 0,5 a 2 % en peso o 0,5 % a 1 % en peso del ingrediente activo.

10 De manera alternativa, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante la administración de una formulación en solución o suspensión líquida, por ejemplo, empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Virginia).

15 El anticuerpo de la invención se puede administrar disperso en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica adecuada, por ejemplo, solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para alcanzar un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Por ejemplo, se puede emplear una suspensión de anticuerpo liofilizado.

20 Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes se conocen bien en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generalmente se proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

25 Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/solución tamponada utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución del disolvente tamponado estéril y la administración de la formulación en recipientes estériles mediante métodos familiares para los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable según la presente descripción se puede proporcionar, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) envasados en películas de papel aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de disolvente/solución tampón.

30 Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser adecuados para la administración vía nebulización.

También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se pueda administrar mediante el uso de terapia génica. Para lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula del anticuerpo bajo el control de componentes apropiados de ADN se introducen en un paciente, de tal manera que las cadenas de anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y se ensamblen *in situ*.

35 En una realización, la presente descripción comprende el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos como un reactivo o diagnóstico, por ejemplo, conjugado con una molécula informadora. De este modo, se proporciona un anticuerpo o fragmento según la descripción que está marcado. En un aspecto, se proporciona una columna que comprende un anticuerpo o fragmento según la descripción.

40 Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento para utilizar como un reactivo para usos tales como:

1) purificación de la proteína CSF-1R (o fragmento de unión de la misma) – que se conjuga con una matriz y se utiliza como una columna de afinidad, o (como una forma modificada de anti-CSF-1R) como un agente precipitante (por ejemplo, como una forma modificada con un dominio reconocido por otra molécula, que puede ser modificado), que se precipita opcionalmente por un reactivo anti-Fc)

45 2) detección y/o cuantificación de CSF-1R sobre células o dentro de células, vivas o fijas (células *in vitro* o en tejidos o secciones de la célula). Los usos para esto pueden incluir la cuantificación de CSF-1R como un biomarcador, para seguir el efecto del tratamiento con anti-CSF-1R. Para estos fines, el candidato se podría utilizar en una forma modificada (por ejemplo, mediante la adición de otra porción, como una proteína de fusión genética o un conjugado químico, tal como la adición de una molécula informadora, por ejemplo, una etiqueta fluorescente utilizada para fines de detección).

50 3) purificación o clasificación de células que tienen CSF-1R marcadas mediante la unión al candidato modificado por las maneras ejemplificadas en (1) y (2).

Comprender, en el contexto de la presente especificación, significa incluir.

Cuando sea técnicamente apropiado, las realizaciones de la invención se pueden combinar.

Las realizaciones como se describen en la presente memoria comprenden ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a las realizaciones separadas que consisten, o consisten esencialmente, en dichas características/elementos.

5 Cualquier realización específica y explícitamente mencionada en esta memoria puede formar la base de una exclusión expresa de un subconjunto del conjunto reivindicado ("disclaimer"), ya sea a solas o en combinación con una o más realizaciones adicionales.

La presente invención se describe adicionalmente a manera de ilustración solo en los siguientes ejemplos, que se refieren a las siguientes figuras:

- | | | |
|----|-----------------------|---|
| | Figura 1A a 1F | muestra ciertas secuencias de aminoácidos y polinucleótidos. |
| 10 | Figura 2A y 2B | muestra alineaciones de ciertas secuencias. |
| | Figura 3 | muestra la secuencia del dominio extracelular de CSF-1R humano codificado por un polinucleótido empleado para transfectar las células y expresar la proteína sobre la superficie de la célula. Estas células fueron empleadas después para inmunizar animales hospedadores. |
| 15 | Figura 4 | muestra la inhibición de la unión de CSF-1 a las células THP-1 por el anticuerpo Ab969. |
| | Figura 5a | muestra la inhibición de la supervivencia y la proliferación mediadas por CSF-1, de monocitos humanos primarios por el anticuerpo Ab969. |
| | Figura 5b | muestra la inhibición de la supervivencia y la proliferación mediadas por IL-34, de monocitos humanos primarios por el anticuerpo Ab969. |
| 20 | Figura 6 | muestra la inhibición de la supervivencia y la proliferación mediadas por CSF-1, de monocitos humanos primarios por el anticuerpo Ab535. |
| | Figura 7 | muestra los niveles de CSF-1R de la superficie celular sobre las células THP-1 incubadas con Ab969, CSF-1 humano y un control de isotipos. |
| 25 | Figura 8 | muestra el nivel relativo de CSF-1R en la superficie celular sobre las células THP-1 tratadas con Ab969 en comparación con el control de isotipos. |
| | Figura 9 | muestra los niveles de CSF-1R en la superficie celular sobre las células RAW264.7 incubadas con Ab 535, CSF-1 y un control de isotipos. |
| | Figura 10 | muestra el nivel relativo de CSF-1R en la superficie celular sobre las células RAW264.7 tratadas con Ab535 en comparación con un control de isotipos. |
| 30 | Figura 11 | muestra el nivel de fosforilación de CSF-1R sobre las células HEK293F transfectadas con CSF-R después de la estimulación con CSF-1 o del tratamiento con Ab969. |
| | Figura 12 | muestra el nivel de secreción de MCP-1 a partir de monocitos humanos primarios cuando se incuban con Ab969 y con CSF-1. |
| 35 | Figura 12 | muestra el nivel de secreción de MCP-1 a partir de monocitos humanos primarios cuando se incuban con Ab969 y con CSF-1. |
| | Figura 13 | muestra el efecto sobre la inhibición de la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 por el anticuerpo humanizado 969.g5 en comparación con Ab969.g0 quimérico. |
| | Figura 14 | muestra el efecto sobre la inhibición de la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 por diversos injertos de anticuerpo humanizado de Ab969. |
| 40 | Figura 15a | muestra la concentración de CSF-1 en muestras de suero tomadas de monos cinomolgos tratados con una única dosis intravenosa de 7 mg/kg de Ab969.g2. |
| | Figura 15b | muestra la concentración de CSF-1 en muestras de suero tomadas de monos cinomolgos tratados con una única dosis intravenosa de 1,5 mg/kg de Ab969.g2. |
| 45 | Figura 15c | muestra el efecto del anticuerpo Ab969.g2 administrado a monos cinomolgos a dosis de 7 mg/kg y 1,5 mg/kg en monocitos no clásicos en circulación a diferentes puntos de tiempo. |
| | Figura 16 | muestra el efecto antitumoral del anticuerpo Ab535, contra un anticuerpo control, un control positivo y el vehículo control en ratones atímicos inmunodeficientes que portan trasplantes subcutáneos del xenoinjerto de cáncer de mama humano MCF-7. |

- Figura 17** muestra la eficacia antitumoral del anticuerpo Ab535 contra un anticuerpo control, un control positivo y el vehículo control en un modelo de cáncer de próstata ortotópico PC-3.
- Figura 18a** muestra el efecto del tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 sobre la concentración de colágeno en BALF en comparación con un control de isotipos.
- 5 **Figura 18b** muestra el efecto del tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 sobre la patología fibrótica de las muestras de pulmón por el puntaje Ashcroft en comparación con un control de isotipos.
- Figura 18c** muestra el efecto del tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 sobre la concentración de albúmina en el suero en comparación con un control de isotipos.
- 10 **Figura 18d** el número de macrófagos en el fluido BAL de ratones a partir de un estudio de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y que muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo el número de macrófagos en fluido BAL en comparación con los animales tratados con el control de isotipos. Los datos se muestran como medias \pm SEM; *Denota una diferencia significativa del isotipo salino; # denota diferencias significativas de los ratones tratados con bleomicina dosificados con el anticuerpo control de isotipos ($p \leq 0,05$).
- 15 **Figura 19** imágenes representativas del análisis histopatológico de pulmones a partir de animales tratados con solución salina control, bleomicina plus control de isotipos y bleomicina plus Ab535.
- 20 **Figura 20a** muestra el efecto del tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 sobre la concentración de colágeno en BALF en comparación con el tratamiento con el control de isotipos.
- Figura 20b** muestra el efecto del tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 sobre la patología fibrótica de muestras de pulmón medidas mediante el puntaje Ashcroft en comparación con el tratamiento con el control de isotipos.
- 25 **Figura 20c** muestra el efecto del tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 sobre la concentración de albúmina en el suero en comparación con el tratamiento con el control de isotipos.
- Figura 20d** muestra el número de macrófagos en el fluido BAL de ratones a partir de un modelo deficiente en ADA de fibrosis pulmonar y muestra que el tratamiento de los ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 redujo el número de macrófagos en el fluido BAL.
- 30 **Figura 21** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de los pulmones a partir de ratones normales (ADA+) y ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida (ADA-) tanto en animales tratados con el control de isotipos como en animales tratados con Ab535.
- 35

Ejemplos

Ejemplo 1 – Generación de un anticuerpo anti-CSF-1R

Inmunización:

- 40 Se inmunizaron ratas Sprague Dawley, hembras, con fibroblastos RFL6 singénicos de rata que habían sido transitoriamente transfectados con un vector que expresa el dominio extracelular del CSF-1R humano enlazado a un anclaje de glucosilfosfatidil-inositol (GPI). La Figura 3 muestra SEQ ID NO: 39 que es la secuencia del dominio extracelular del CSF-1R humano utilizada en la inmunización de ratas.

- 45 Las ratas recibieron cinco inmunizaciones subcutáneas a intervalos de 3 semanas de $3-9 \times 10^6$ células transfectadas por animal. Se inyectó adyuvante completo de Freund (50% en PBS) en un sitio adyacente con la primera inmunización celular. Dos semanas después de la inmunización final, se cosecharon las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y los bazos.

Selección primaria de los sobrenadantes del anticuerpo

- 50 Los sobrenadantes del anticuerpo se seleccionaron inicialmente por su capacidad de unirse al CSF-1R humano expresado sobre las células HEK293 transfectadas por tecnología de ensayo de fluorescencia en microvolumen (FMAT).

Se identificaron aproximadamente 1000 pocillos con reactividad a anti-CSF-1R en una selección FMAT primaria de

placas de pocillos de 600 x 96. En total, se seleccionaron aproximadamente 3×10^8 células B (esplenocitos de rata) para la producción de anticuerpos de unión a CSF-1R mediante FMAT.

Selección secundaria de los sobrenadantes del anticuerpo

5 Se concibió un ensayo de producción de medio para identificar los pocillos positivos a FMAT que contenían actividad neutralizante anti-CSF-1R, por ejemplo, los anticuerpos que tenían la capacidad de prevenir la unión de CSF-1 humano al receptor de CSF-1R humano. Los sobrenadantes del anticuerpo se incubaron con células THP-1 que expresan CSF-1R antes de la incubación con CSF-1 humano. El nivel de unión de CSF-1 a las células THP-1 se midió por citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal anti-CSF-1. Los sobrenadantes del anticuerpo irrelevante se utilizaron como controles negativos.

10 Se aplicó la selección secundaria a los sobrenadantes a partir de 779 pocillos con anticuerpo y 88 de estos pocillos demostraron actividad de bloqueo a CSF-1 detectable.

Selección terciaria de los sobrenadantes del anticuerpo

15 Los sobrenadantes del anticuerpo que mostraron actividad neutralizante en la segunda selección se ensayaron para determinar su capacidad de prevenir la supervivencia dependiente de CSF-1 de los monocitos humanos primarios. Los monocitos se purificaron a partir de sangre humana y 1×10^4 células se incubaron con cada sobrenadante del anticuerpo en presencia de 20ng/ml de CSF-1 humano. Después de una incubación de 72 horas, se midió el número de monocitos viables mediante el ensayo CellTiter Glo.

20 La selección terciaria se aplicó a los sobrenadantes de 59 de los pocillos con anticuerpo identificados en la selección secundaria y se demostró que 18 pocillos tenían la capacidad de reducir la supervivencia del monocito mediada por CSF-1.

Clonación de las regiones variables del anticuerpo y re-análisis de la actividad de bloqueo

25 Se intentó la clonación de la región variable (región V) a partir de 18 pocillos con anticuerpo demostrando la actividad de neutralización de CSF-1. Las regiones V de cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina se amplificaron por RT-PCR utilizando los iniciadores específicos a las regiones constantes del anticuerpo de rata y un conjunto de primer redundante que se une a las secuencias que codifican los péptidos líder de inmunoglobulina de rata. Los genes de las regiones V se recuperaron a partir de 14 anticuerpos y se clonaron en los vectores de expresión de la IgG4 humana de cadena pesada y ligera.

30 Los pares de vectores del anticuerpo se transfectaron de manera transitoria dentro de las células HEK293F y el medio acondicionado se ensayó para actividad neutralizante de CSF-1 en las células THP-1 (como se describió antes). Nueve de los anticuerpos tuvieron la capacidad de inhibir parcial o completamente la unión de CSF-1 en comparación con el medio acondicionado control.

Análisis de secuencia de nueve anticuerpos neutralizantes anti-CSF-1R

Los nueve anticuerpos neutralizantes se secuenciaron para evaluar la diversidad de la secuencia. Todos los nueve anticuerpos fueron únicos. Estos anticuerpos se clonaron y se expresaron para estudios adicionales de perfilamiento.

35 **Ejemplo 2 – Propiedades *in vitro* del Ab969 quimérico anti-CSF-1R humano y Ab535 anti-CSF-1R murino**

i) Ab969 quimérico de expresión

Las regiones variables de los nueve anticuerpos neutralizantes identificados en el Ejemplo 1 se clonaron dentro de vectores separados de expresión de cadena pesada y ligera y se expresaron como anticuerpos IgG4 humanos de longitud total.

40 Los genes VH se clonaron dentro del vector pVhg4FL(V19H), el cual contiene el ADN que codifica una secuencia líder natural y la región constante de cadena pesada gamma-4 de humano con la mutación estabilizante de bisagra S241P. Los genes VL (kappa) se clonaron dentro del vector pKH10.1(V4L), el cual contiene el ADN que codifica una secuencia líder natural y la región constante de la cadena kappa humana (alotipo Km3).

45 Los anticuerpos se expresaron mediante co-transfección transitoria de pares vectores coincidentes de cadena pesada y ligera dentro de las células CHO-K1. La purificación de los anticuerpos dentro de PBS pH 7,4 se realizó de manera que el nivel de agregado al final de la preparación era menor de 1%.

50 El panel de nueve anticuerpos incluyó un anticuerpo designado anticuerpo 969. El anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de rata y la región constante de cadena pesada gama-4 humana y la región constante de cadena kappa humana se refiere como el anticuerpo 969 o el anticuerpo 969cHcL o el anticuerpo 969.g0 en los siguientes ejemplos.

ii) Ensayo de bloqueo al ligando

Se evaluó la capacidad de cada uno de los nueve anticuerpos para inhibir la unión de CSF-1 a las células THP-1 mediante citometría de flujo. Las células THP-1 se incubaron con cada anticuerpo a 0,5, 0,125, 0,031, 0,0078 y 0,00195 µg/ml por 30 minutos. Un anticuerpo IgG4 irrelevante sirvió como un control de isotipos. Después del lavado, las células se incubaron con 0,5 µg/ml de CSF-1 humano por 30 minutos. Después del lavado adicional, se detectó la unión de CSF-1 mediante incubación secuencial con anticuerpo anti-CSF-1 biotinilado y estreptavidina conjugada a Alexa488. Se midió el liando unido al receptor mediante citometría de flujo y se representó gráficamente la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI).

iii) Inhibición de la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 e IL-34

10 Anti-CSF-1R humano:

Los anticuerpos anti-CSF-1R de humano purificados se ensayaron para su capacidad de inhibir la supervivencia y proliferación de monocitos primarios humanos activados por CSF-1 e IL-34. En cada ensayo, se utilizó el mitógeno (CSF-1 o IL-34) a una concentración que produjo la estimulación máxima de los monocitos.

15 Las PBMCs humanas se prepararon a partir de sangre fresca completa humana en un gradiente de Ficoll y los monocitos se purificaron mediante selección negativa. Los monocitos se incubaron con 0,25 µg/ml de anticuerpo y 20 ng/ml de CSF-1 por 72 horas y se determinó el número relativo de células viables utilizando el análisis CellTiter Glo. La lectura de la luminiscencia se correlaciona con el número de células viables. Los resultados se muestran en la Figura 5a.

20 Las PBMCs humanas se prepararon a partir de células frescas completas humanas en un gradiente de Ficoll y los monocitos se purificaron mediante selección negativa. Los monocitos se incubaron con 0,25 µg/ml de anticuerpo y 20 ng/ml de IL-34 por 72 horas y se determinó el número relativo de células viables utilizando el análisis CellTiter Glo. La lectura de la luminiscencia se correlaciona con el número de células viables. Los resultados se muestran en la Figura 5b.

25 Cuatro de los anticuerpos que incluyeron a Ab969 demostraron la inhibición superior de la supervivencia de monocitos en comparación con los anticuerpos remanentes tanto para la estimulación de CSF-1 (Figura 5a) como de IL-34 (Figura 5b), en línea con sus actividades de bloqueo del ligando.

30 Se purificaron monocitos CD11b+ primarios murinos obtenidos a partir de bazos de ratones. Los monocitos se incubaron después con una titulación de CSF-1 murinos (mCSF-1) durante 24 horas. Se midió la liberación de MCP-1 dentro del medio de células por ELISA y se demostró la liberación dependiente de la dosis de MCP-1 mediante mCSF-1. En una rama del estudio aparte, se añadieron 10 µg/ml de Ab535 CSF-1R anti-murino junto con la titulación de mCSF-1. La liberación de MCP-1 se inhibió completamente por Ab535 a todas las concentraciones de CSF-1 ensayadas (Figura 6).

35 Se realizó el ensayo de liberación de MCP-1 utilizando monocitos primarios murinos con una concentración constante de CSF-1 de 100 ng/ml y una titulación de Ab535. Se demostró la inhibición dependiente de la dosis de la liberación de MCP-1 y se calculó una IC₅₀. La IC₅₀ media de Ab535 a partir de dos experimentos independientes se determinó como de 8,08 ng/ml.

40 Conclusión: el tratamiento de monocitos murinos con CSF-1 ocasionó una liberación dependiente de la dosis de MCP-1, el cual se inhibió completamente por el tratamiento con 10 µg/ml de Ab535. Ab535 inhibe la liberación de MCP-1 impulsada por CSF-1 a partir de monocitos murinos de manera dependiente de la dosis, con una IC₅₀ media de 8,08 ng/ml (n=2). Este valor IC₅₀ es similar al exhibido por los anticuerpos anti-CSF-1R de humano.

iv) Afinidad

Los anticuerpos se ensayaron para determinar su capacidad de unirse a CSF-1R en un ensayo BIAcore por medición de la cinética de unión a una proteína de fusión CSF-1R/Fc recombinante purificada.

45 El formato del ensayo fue una captura de los anticuerpos anti-CSF-1R por anti-IgG,F(ab')₂ humana inmovilizada, después una titulación de hCSF-1R/Fc sobre la superficie capturada. Se realizó BIA (Biomolecular Interaction Analysis) utilizando un BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C. El fragmento Affinipure F(ab')₂ de IgG cabra anti-humano, específico del fragmento F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizó en un Chip Sensor CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) vía química de acoplamiento de amina hasta un nivel de ~5000 unidades de respuesta (RU). El tampón HBS-EP (10mM HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 50 0,005% de tensioactivo P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) se utilizó como el tampón del proceso con una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se llevó a cabo una inyección de un anticuerpo anti-CSF-1R para producir un nivel de captura de aproximadamente 100 RU sobre IgG,F(ab')₂ anti-humano inmovilizado.

CSF-1R/Fc recombinante humano (R&D Systems) no tuvo en cuenta el anticuerpo anti-CSF-1R capturado a 5nM a una velocidad de flujo de 30 µl/min por 5 min, luego la velocidad de flujo aumentó a 100 µl/min por 30 min para la fase

de disociación. La inyección a 5nM se realizó dos veces junto con el tampón control correspondiente. Estos sensogramas se utilizaron para generar la velocidad de disociación. CSF-1R/Fc recombinante humano se tituló sobre el anticuerpo anti-CSF-1R capturado de 2,5nM a una velocidad de flujo de 30ul/min por 5 min seguido por una fase de disociación de 10min. Estos sensogramas se utilizaron para generar la velocidad de disociación. La superficie se regeneró a una velocidad de flujo de 10ul/min por una inyección de 10ul de HCl 40 mM seguida de una inyección de NaOH 10mM. Las curvas de unión de fondo sustraídas de doble referencia de analizaron utilizando el software BIAevaluation (versión 4.1) siguiendo a los procedimientos estándar. Se determinaron los parámetros cinéticos a partir del algoritmo de ajuste.

Tres de los cuatro anticuerpos ensayados mostraron afinidades (K_D) menores de 10pM. Esto se compara favorablemente con el reactivo paralelo anti-CSF-1R de murino, Ab535. Los resultados para Ab969 y Ab553 se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1:

Anticuerpo	Constante de asociación K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	Constante de disociación K_d (s^{-1})	Afinidad K_D (M)	Afinidad K_D (pM)
Ab969	$2,58 \times 10^6$	$2,49 \times 10^{-5}$	$9,65 \times 10^{-12}$	9,6
Ab535	$2,24 \times 10^6$	$1,06 \times 10^{-5}$	$4,73 \times 10^{-12}$	4,7

La afinidad de los anticuerpos también se midió mediante un ensayo basado en células utilizando células THP-1. Los anticuerpos se marcaron directamente con tinte fluorescente Alexa-488 y la afinidad se midió mediante citometría de flujo cuantitativa. Un análisis adicional de BIAcore confirmó que la conjugación fluorescente de los anticuerpos no alteraba la afinidad hacia la proteína CSF-1R recombinante. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Los valores de afinidad absoluta derivados de las dos metodologías son diferentes, y esta diferencia generalmente se observa cuando se comparan los dos sistemas. Sin embargo, el método basado en células demostró que los anticuerpos se unen a CSF-1R con alta afinidad.

Tabla 2

Anticuerpo	Afinidad basada en células $KD \pm S.D.$ (nM)	BIAcore afinidad KD (pM)
Ab969	$2,20 \pm 0,19$	4,80

iv) Inhibición de la unión de CSF-1 (IC_{50})

Se analizaron cuatro anticuerpos midiendo su potencia relativa en la inhibición de la unión de CSF-1 a células THP-1. Los cuatro anticuerpos mostraron una potente inhibición de la unión de CSF-1 con valores de IC_{50} de menos de 5 ng/ml (~30 pM) en este formato de ensayo.

Tabla 3

Anticuerpo	Media $IC_{50} \pm S.D.$ (ng/ml)
Ab969	$2,89 \pm 1,22$

vi) Reactividad cruzada del anticuerpo

Se analizaron cuatro anticuerpos para determinar la reactividad cruzada con CSF-1R de longitud completa canino, de monos rhesus, y de monos cinomolgos. Los cuatro anticuerpos se unieron a CSF-1R de rhesus y cinomolgo además de a CSF-1R humano, demostrando una clara unión significativamente por encima del nivel del control de isotipos.

Tabla 4

Anticuerpo	Reactividad cruzada		
	Cinamolgo	Rhesus	Canino
Ab969	Si	Si	No

vii) Internalización de CSF-1R

Ab969:

5 Las células THP-1 se incubaron con Ab969 durante 0, 0,5, 2, 4, 24 y 48 horas. Las células también se trataron con CSF-1 humano y un control de isotipos que sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente. En cada punto temporal, se midió el nivel de CSF-1R de la superficie celular mediante citometría de flujo (Figura 7). Se calculó el nivel relativo de CSF-1R de la superficie celular en las células tratadas con Ab969 en comparación con el control de isotipos y se muestra en la Figura 8.

El tratamiento de las células THP-1 con CSF-1 recombinante causó una disminución rápida y sostenida en el nivel de CSF-1R de la superficie celular; el ligando natural se une a su receptor afín e impulsa la internalización del complejo ligando-receptor.

10 Las células THP-1 tratadas con Ab969 mostraron niveles más altos de expresión de CSF-1R de la superficie celular en comparación con las células THP-1 tratadas con control de isotipos y sin tratar durante todo el curso de tiempo de 48 horas. Estos datos sugieren firmemente que el tratamiento de las células THP-1 con Ab969 no causa la internalización de hCSF-1R expresado en la superficie celular hasta 48 horas después del tratamiento.

15 A medida que avanzaba el curso del tiempo, hubo un aumento notable en CSF-1R expresado en la superficie celular en las células THP-1 no tratadas y tratadas, con la excepción de las células tratadas con CSF-1. Esto podría deberse a cambios en la expresión durante el período de crecimiento celular durante el período de tiempo de 48 horas del experimento y podría haber sido, potencialmente, una respuesta de estrés.

20 Con el fin de proporcionar evidencia adicional de que Ab969 no potencia la internalización del receptor, y también excluyendo la posibilidad de que la línea celular THP-1 no sea fisiológicamente relevante, de igual manera se utilizaron monocitos humanos primarios en un ensayo de internalización. Los datos de este ensayo también demostraron que Ab969 no causa una internalización rápida de CSF-1R de la superficie celular en monocitos humanos primarios sanos.

Ab535:

La línea celular de monocitos/macrófagos leucémicos de ratón RAW264.7 expresa niveles altos de CSF-1R de murino (mCSF-1R) y representa un sistema celular adecuado para probar si el anticuerpo anti-CSF-1R de murino Ab535 puede provocar la internalización del receptor.

25 Las células RAW264.7 se incubaron con Ab535 durante 0, 0,5, 2, 4, 24 y 48 horas. Las células también se trataron con CSF-1 humano y un control de isotipos que sirvieron como controles positivo y negativo respectivamente. En cada punto temporal, se midió el nivel de CSF-1R de la superficie celular mediante citometría de flujo (Figura 9). Se calculó el nivel relativo de CSF-1R de la superficie celular en comparación con el isotipo y se muestra en la Figura 10.

30 Los datos muestran que el tratamiento de las células THP-1 con CSF-1 recombinante causó una disminución rápida y sostenida en el nivel de CSF-1R de la superficie celular.

Se observó una clara reducción de los niveles de mCSF-1R en la superficie celular en células RAW264.7 tratadas con CSF-1 humano durante 2 horas en relación con las células sin tratar y tratadas con control de isotipos. Esta reducción se mantiene a lo largo del estudio de 48 horas. Esto demuestra que el CSF-1 humano provoca la internalización de mCSF-1R y valida el sistema experimental para monitorear la internalización del receptor.

35 Las células RAW264.7 tratadas con Ab535 exhiben niveles similares de mCSF-1R de la superficie celular en comparación con las células sin tratar y las tratadas con control de isotipos durante todo el curso de tiempo de 48 horas. Como se espera que la internalización del receptor mediado por anticuerpos ocurra dentro de este marco de tiempo, estos datos sugieren fuertemente que Ab535 no desencadena la internalización de mCSF-1R.

40 Con el fin de proporcionar evidencia adicional de que Ab535 no potencia la internalización del receptor, se utilizaron monocitos-macrófago CD11b+ murinos primarios en un ensayo de internalización. Estos resultados también demostraron que el tratamiento de los monocitos-macrófagos de ratón con Ab535 no causa la internalización de mCSF-1R expresado en la superficie celular hasta 24 horas después del tratamiento.

viii) Activación de CSF1-R

45 El CSF-1 se une al CSF-1R, causando la formación de dímeros del receptor, lo que desencadena una rápida fosforilación del receptor al juntar los dominios de la quinasa. Esto conduce posteriormente a la internalización del receptor y la activación de varias vías de transducción de señales bien caracterizadas, incluida la vía Ras-MAPK. Es posible que un anticuerpo anti-CSF-1R pueda provocar la agrupación de receptores y desencadenar una cascada de señalización cascada abajo. Esta puede ser una propiedad no deseada de un anticuerpo que debería inhibir la señalización del receptor, por lo que el agonismo del receptor por Ab969 se probó utilizando dos formatos de ensayo
50 *in vitro* independientes.

En el primer formato de ensayo, los anticuerpos se incubaron con células transfectadas con CSF-1R de longitud completa humana y la fosforilación del receptor y las moléculas de transducción de señal cascada abajo se monitorearon mediante transferencia Western.

La línea celular THP-1 representó un punto de partida para monitorear el estado de activación de CSF-1R. Sin embargo,

el nivel de expresión de CSF-1R en esta línea celular es relativamente bajo, lo que dificulta la realización de un análisis bioquímico. Por lo tanto, se diseñó un sistema experimental para que el nivel de fosforilación de CSF-1R se pudiera detectar de manera robusta. La fosforilación de CSF-1R se puede detectar en dos restos de tirosina, Y723 e Y809. Además, se midió la fosforilación de p44/42 MAPK (Erk1/2) en T202 e Y204 como una lectura independiente de la actividad de CSF-1R. La estimulación con CSF-1 se incluyó como control positivo en todos los experimentos.

Las células HEK293F se transfectaron con un vector plasmídico que expresaba CSF-1R de longitud completa. Después de 24 horas de incubación en condiciones libres de suero, las células se estimularon con una titulación de 100 µg/ml a 0,001 µg/ml de Ab969.g0 durante 5 minutos. Las células también se trataron con 500 ng/ml de CSF-1 recombinante para proporcionar un control positivo. Las células no tratadas se incluyeron como control negativo. Los lisados de proteína de las células tratadas y no tratadas se separaron mediante electroforesis con SDS-poliacrilamida y se transfirieron a nitrocelulosa. La inmunotransferencia Western se realizó utilizando anticuerpos contra fosfo-Y723 CSF-1R (Cell Signaling Technology #3151), fosfo-Y809 (Cell Signaling Technology #3154), CSF-1R total (Cell Signaling Technology #3152) y fosfo-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (Cell Signaling Technology #5301).

Las células HEK293F transfectadas con CSF-1R no estimuladas mostraron un bajo nivel basal de fosforilación de CSF-1R. La estimulación de células con CSF-1 dio como resultado un nivel de fosforilación de CSF-1R en los restos Y723 e Y809 fácilmente observados por análisis de transferencia Western (Figura 11). También hubo una clara estimulación de la fosforilación de ERK1/2 después del tratamiento con CSF-1. El tratamiento de las células HEK293F transfectadas con el anticuerpo Ab969.g0 no estimuló la fosforilación de CSF-1R ni potenció la activación de ERK1/2.

En un segundo ensayo, el anticuerpo Ab969 (monomérico y reticulado) se incubó con monocitos humanos primarios y se usó la secreción de MCP-1 como marcador de activación de CSF-1R. El tratamiento con CSF-1 de monocitos humanos hace que liberen la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1). Si los anticuerpos anti-CSF-1R tienen la capacidad de activar al receptor CSF-1R en monocitos, se esperaría una liberación de MCP-1.

Los ensayos bioquímicos antes descritos solo utilizaban anticuerpos monoméricos anti-CSF-1R. Sin embargo, es posible que una IgG1 reticulada tenga una capacidad mejorada para acercar las moléculas de CSF-1R y desencadenar la fosforilación de la tirosina y la señalización corriente abajo. Para evaluar esto, el ensayo MCP-1 también se realizó utilizando Ab969.g0 que se había entrecruzado con un anticuerpo anti-Fc humano.

Los monocitos humanos se prepararon a partir de sangre completa humana de la siguiente manera: se recolectaron 60-100 ml de sangre completa humana en tubos BD Vacutainer de 10 ml con 171 IU de heparina lio. La sangre se dividió en 3-4 tubos Leucosep Ficoll (Greiner Bio-One) y se llenaron con PBS. Los tubos se centrifugaron a 1000 g, 20°C durante 10 minutos sin freno, y se recogió la capa de PBMC. Las células se sedimentaron y luego se aislaron los monocitos utilizando esferas de CD14 humanas de selección positiva (Miltenyi Biotec 130-050-201) según el protocolo del fabricante. El anticuerpo Ab969.g0 se reticuló mediante la adición del anticuerpo anti-IgG Fc humano de cabra (R&D Systems G-102-C) en una proporción de 2:1 Ab969.g0:Fc. Se sembraron monocitos a 20,000 células por pocillo en medio en la presencia de una dosis de titulación del anticuerpo Ab969.g0 o Ab969.g0 reticulado (series de dilución de medio logaritmo que comprenden 16 concentraciones, máximo 10 µg/ml). Los pocillos de control no contenían anticuerpo, en presencia y ausencia de 100 ng/ml de CSF-1, y en presencia y ausencia del anticuerpo anti-Fc humano (a la misma concentración que se presenta en la concentración superior del anticuerpo Ab969.g0 (5 µg/ml)). Las células se incubaron durante 24 horas, las placas se centrifugaron para sedimentar las células y se recogió el sobrenadante. La MCP-1 secretada se midió por MSD (K151AYB-2) según el protocolo del fabricante.

El resultado del experimento se muestra en la Figura 12. No se detectó ningún aumento en los niveles de MCP-1 para ninguno de los tratamientos con Ab969.g0, ya sea en el formato monomérico o reticulado; la concentración de MCP-1 en el medio de las células tratadas fue idéntica a la de las células no tratadas. Como se esperaba, las células tratadas con CSF-1 produjeron un aumento significativo y reproducible en los niveles de MCP-1.

Ejemplo 3 - Humanización del anticuerpo 969 y selección de injerto humanizado

Se seleccionaron cuatro anticuerpos anti-CSF-1R para humanización en función de su afinidad y propiedades medidas en el Ejemplo 2.

i) Generación de injertos humanizados.

El anticuerpo 969 y 970 se humanizó injertando las CDRs de las regiones V del anticuerpo de rata en los marcos de la región V del anticuerpo de la línea germinal humana.

Las CDRs injertadas a partir del donante a la secuencia aceptora son las definidas por Kabat (Kabat *et al.*, 1987), con la excepción de CDR-H1 donde se utiliza la definición combinada de Chothia/Kabat (véase Adair *et al.*, 1991, Humanised antibodies. WO91/09967).

La región V humana VK1 2-1(-1) 012 más la región J JK4 (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como el aceptador para las CDRs de cadena ligera. La región V humana VH2 3-1 2-70 más la región J JH3 (V BASE, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) se eligió como el aceptador para las CDRs de cadena pesada.

Varios restos del marco a partir de las regiones V de rata se retuvieron en las secuencias humanizadas, como se muestra en la Tabla 1.

5 Los genes que codifican secuencias de la región V de cadena ligera y pesada humanizadas iniciales, denominadas gL1 y gH1, respectivamente, se diseñaron y construyeron mediante un enfoque de síntesis automatizado. Se crearon variantes adicionales tanto de las regiones V de cadena ligera como de cadena pesada al modificar los genes gL1 y gH1 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.

10 Los genes VK (gL1 a gL9) se clonaron en el vector de expresión de la cadena ligera humana pKH10.1, que contiene el ADN que codifica la región constante de la cadena Kappa humana (alotipo Km3). Los genes VH (gH1 y gH2) se clonaron en el vector de expresión de cadena pesada gamma-4 humana pVhy4P FL, que contiene el ADN que codifica la región constante de cadena pesada gamma-4 humana con la mutación estabilizante de la bisagra S241P (Angal et al., 1993, Mol Immunol. 30:105-8). Diferentes combinaciones de plásmidos que codifican la variante de las cadenas ligeras y pesadas se cotransfectaron en HEK293F, dando como resultado la expresión de los anticuerpos 969 recombinantes humanizados.

15 Los otros tres anticuerpos anti-CSF-1R también se humanizaron al proporcionar un injerto conservador que contiene una cantidad de restos de donantes en las cadenas pesada y ligera que se predice que es importante y un injerto completamente humanizado que no contiene restos de donantes.

ii) Afinidad de anticuerpos humanizados.

20 Cada injerto humanizado se evaluó para determinar (i) la afinidad de unión al CSF-1R humano mediante BIAcore y (ii) la temperatura de fusión (T_m) medida mediante análisis ThermoFluor, ambos en relación con el anticuerpo quimérico parental. Se cree que la temperatura de fusión proporciona una indicación temprana de la estabilidad de una molécula de anticuerpo, con los anticuerpos inestables mostrando típicamente una T_m inferior a 75.0°C.

25 Los injertos que representan las etapas de humanización de Ab969 se muestran en la Tabla 5. La Tabla 5 también muestra el anticuerpo quimérico Ab696 (969cHcL). El injerto conservador (969gH1gL1) exhibió una constante de afinidad (K_D) de 2,4 pM, por lo que no hubo pérdida aparente de afinidad en comparación con el anticuerpo quimérico de rata (969cHcL). La T_m del injerto conservador 969gH1gL1 fue de 78,8°C y, por lo tanto, por encima de un valor umbral de 75,0°C. La sustitución del resto del donante A78 por V78 en la cadena pesada para producir 969gH2gL1 no redujo la afinidad del anticuerpo ($K_D = 2,3$ pM). Tras la sustitución gradual de los restos donantes K38, Y71 y F87, a Q38, F71 e Y87 respectivamente, no se observaron cambios en la afinidad. El injerto humanizado final 969gH2gL8 que no contenía restos del donante mostró una afinidad similar al anticuerpo quimérico parental (4,1 pM).

30

Tabla 5

Anticuerpo de injerto	restos del donante VK	restos del donante VH	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969cHcL	N/A	N/A	2,31E+06	7.99E-06	3,5
969gH1gL1	K38, Y71, F87	A78	2,04E+06	5.00E-06	2,4
969gH1gL2	Y71, F87	A78	1,46E+06	5.00E-06	3,4
969gH1gL3	K38, F87	A78	1,80E+06	5.00E-06	2,8
969gH1gL4	K38, Y71	A78	2,39E+06	5.00E-06	2,1
969gH1gL5	F87	A78	9,26E+05	6.11E-06	6,6
969gH1gL6	K38	A78	1,15E+06	5.00E-06	4,4
969gH1gL7	Y71	A78	1,50E+06	5.00E-06	3,3
969gH1gL8	-	A78	1,17E+06	5.00E-06	4,3
969gH2gL1	K38, Y71, F87	-	2,27E+06	5.23E-06	2,3
969gH2gL2	Y71, F87	-	1,78E+06	6.11E-06	3,4
969gH2gL3	K38, F87	-	2,12E+06	7.29E-06	3,4
969gH2gL4	K38, Y71	-	2,20E+06	9.64E-06	4,4

Anticuerpo de injerto	restos del donante VK	restos del donante VH	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969gH2gL5	F87	-	7,68E+05	5.00E-06	6,5
969gH2gL6	K38	-	1,40E+06	6.23E-06	4,4
969gH2gL7	Y71	-	1,40E+06	5.00E-06	3,6
969gH2gL8	-	-	1,23E+06	5.00E-06	4,1

- 5 Ab969 posee un motivo de isomerización DG potencial en la unión de CDR-L2 y el marco. Este resto de ácido aspártico en el sitio DG en los injertos 969gH2gL7 y 969gH2gL8 se mutó a serina para dar una secuencia inerte de SG. La afinidad hacia CSF-1R se midió mediante BIAcore y no se detectó ninguna pérdida aparente de afinidad (Tabla 6). Además, los injertos finales 969H2gL7(SG) y 969gH2gL8(SG) retuvieron una T_m alta de 80,5°C y 79,9°C, respectivamente.

Tabla 6

Anticuerpo de injerto	restos del donante VK	restos del donante VH	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969cHcL	N/A	N/A	4,35E+06	8,53E-06	2,0
969gH2gL7 DG	Y71	-	2,56E+06	7,16E-06	2,8
969gH2gL7 SG	Y71	-	2,54E+06	5,00E-06	2,0
969gH2gL8 DG	-	-	2,18E+06	5,00E-06	2,3
969gH2gL8 SG	-	-	3,22E+06	5,00E-06	1,6

- 10 La humanización de Ab969 y otro anticuerpo anti-CSF-1R Ab970 generó anticuerpos completamente humanizados (sin restos de donantes de rata presentes) con una afinidad (K_D) equivalente al anticuerpo quimérico parental y una T_m que dio una predicción inicial de la estabilidad de la molécula. La versión completamente humanizada de Ab969 (969gH2gL8 SG) cambió su nombre a Ab969.g5. De aquí en adelante, la versión quimérica de Ab969 se denominará Ab969.g0.

- 15 La afinidad de los injertos quiméricos y humanizados purificados de los anticuerpos Ab969 contra CSF-1R recombinante se midió de nuevo utilizando un análisis BIAcore. Los experimentos previos de BIAcore realizados durante el proceso de humanización se llevaron a cabo utilizando sobrenadantes de células sin tratamiento en lugar de anticuerpos purificados. Se detectó una ligera reducción en la afinidad, con valores de K_D incrementados de aproximadamente 4 pM a 5 pM.

Tabla 7

Anticuerpo	Experimento	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969,g0	1	2,16E+06	9,49E-06	4,4
	2	2,16E+06	9,10E-06	4,2
	Media	2,16E+06	9,30E-06	4,3
969,g5	1	1,63E+06	8,13E-06	5,0
	2	1,50E+06	7,96E-06	5,3
	Media	1,57E+06	8,05E-06	5,1

20

iii) Inhibición de la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 por Ab969.g0 y Ab969.g5

- 25 CSF-1 es necesario para la activación y supervivencia de monocitos en cultivo; si se elimina el CSF-1, los monocitos experimentan rápidamente apoptosis. Se ideó un ensayo que utilizaba MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1; también conocida como CCL2, ligando 2 del motivo C-C de quimiocina) como una lectura. Tras la estimulación con CSF-1, los monocitos humanos secretan MCP-1, que se puede detectar en sobrenadantes celulares mediante un ELISA, generalmente 24 horas después de la estimulación. La inhibición de la señalización de CSF-1R por anticuerpos que bloquean la unión de CSF-1 causa una reducción en la secreción de MCP-1.

Se prepararon PBMCs humanas a partir de sangre completa humana fresca en un gradiente de Ficoll y se purificaron los monocitos CD14⁺ por selección positiva. Se incubaron un total de 2x10⁴ monocitos con una serie de dilución de media logarítmica de 10 µg/ml a 0,35 pg/ml de anticuerpo en presencia de 100 ng/ml de CSF-1 humano durante 24 horas. Se incluyeron controles que comprendían "ningún anticuerpo, ningún CSF-1" y "ningún anticuerpo, con CSF-1" para proporcionar valores de liberación de MCP-1 mínimos y máximos. Después de la incubación durante 24 horas, las células se sedimentaron por centrifugación y se recolectó el sobrenadante. Se midió la concentración de MCP-1 utilizando el ELISA DuoSet CCL2/MCP-1 humano (R&D Systems DY279) siguiendo las instrucciones del fabricante.

De aquí en adelante, el ensayo se denomina 'ensayo de inhibición de MCP-1'.

Se empleó el ensayo de inhibición de MCP-1 para comparar la actividad de 969.g5 humanizado con Ab969.g0 quimérico. Se realizaron cinco ensayos independientes utilizando cuatro donantes diferentes de monocitos. En todos los ensayos, el injerto humanizado Ab969.g5 exhibió una actividad inesperadamente significativamente menor en comparación con el anticuerpo quimérico parental 969.g0. En la Figura 13 se muestra un solo experimento representativo. La IC₅₀ media para 969.g0 en el ensayo de monocitos fue de 24,6ng/ml, en comparación con 333,0ng/ml para 969.g5. Esto indica una disminución de 13,5 veces en la potencia del anticuerpo cuando ambos anticuerpos se comparan utilizando este formato de ensayo.

Se realizó una serie de experimentos con Ab969 para revelar por qué el anticuerpo humanizado exhibió una actividad reducida en el ensayo de inhibición de MCP-1. Los datos sugirieron que la pérdida de actividad de Ab969.g5 observada en el ensayo de inhibición de MCP-1 se debió al orden en que se agregaron el anticuerpo y el ligando a las células diana. La actividad tanto de Ab969.g0 como de Ab969.g5 se redujo cuando se aplicó un formato de ensayo competitivo, pero de manera más importante, se detectó un mayor diferencial en su actividad de bloqueo. Para analizar si una menor constante de asociación de Ab969 humanizado podría ser responsable de la reducción de la potencia, se realizó un análisis BIAcore. Estos datos identificaron que, mientras que la K_D de Ab969.g0 y Ab969.g5 eran similares, la K_a era menor para Ab969.g5, a 1,57x10⁶ M⁻¹s⁻¹ en comparación con 2,16x10⁶ M⁻¹s⁻¹ para 969.g0 (véase la tabla 5). En un ensayo competitivo, donde el CSF-1 y el anticuerpo anti-CSF-1R compiten por unirse al mismo receptor, una activación más lenta del anticuerpo podría resultar en una actividad de bloqueo reducida si la activación del ligando también es alta y el ligando está presente en una alta concentración. Se sabe que el CSF-1 humano tiene una tasa de activación particularmente alta a 2,19x10⁶ M⁻¹s⁻¹, similar a los anticuerpos, y el ensayo se realizó con una alta concentración de CSF-1 (250 ng/ml).

Con el fin de proporcionar evidencia adicional de que la reducción en la actividad de bloqueo de 969.g5 se debió a una propiedad innata del anticuerpo, se desarrolló un ELISA que mide la unión de CSF-1 a CSF-1R. En adelante, este método se denomina "ensayo ELISA de bloqueo de ligando". Este ensayo se realizó utilizando unión competitiva, donde el CSF-1 y el anticuerpo fueron premezclados antes de la aplicación a la placa unida a CSF-1R. El ensayo también se llevó a cabo para evaluar la influencia de la concentración de CSF-1 en la actividad del anticuerpo.

Cuando se midió la IC₅₀ de 969.g0 y 969.g5 en el ELISA de bloqueo de ligando utilizando una concentración de CSF-1 de 1ng/ml, ambos anticuerpos parecían tener una actividad similar con una IC₅₀ de 12,83ng/ml contra 19,65ng/ml, respectivamente. Cuando se usó una concentración de 10 ng/ml de CSF-1 en el ensayo, aumentó la IC₅₀ de Ab969.g0 y Ab969.g5, pero más importante, el diferencial entre ellos aumentó aún más a 79,29 ng/ml contra 268,10 ng/ml, respectivamente. La tendencia continuó en un ensayo con 100 ng/ml de CSF-1, donde Ab969.g0 y Ab969.g5 dieron valores de IC₅₀ de 828,70ng/ml y 3947,00ng/ml, respectivamente. Un ensayo competitivo demuestra que Ab969.g5 es menos activo que Ab969.g0 en el bloqueo de la unión de CSF-1 a CSF-1R. Esta reducción de la potencia se hace más pronunciada a medida que aumenta la concentración de CSF-1.

iv) Identificación de injertos humanizados de Ab 969 con actividad equivalente a Ab 969 quimérico en el ensayo de inhibición de MCP-1

Se preparó un panel de injertos intermedios humanizados Ab969 mediante expresión transitoria para poder comparar la actividad *in vitro* (Tabla 8). El anticuerpo quimérico correspondiente (Ab969.g0) y el injerto completamente humanizado (Ab969.g5) también se incluyeron en la expresión transitoria, de modo que se podría hacer una comparación directa de las características del anticuerpo dentro del mismo lote.

Tabla 8:

Anticuerpo	Injerto	Restos del donante VK	Restos del donante VH
969.g0	969cHcL	N/A	N/A
969.g7	969gH2gL4	K38, Y71	-
969.g9	969gH2gL6	K38	-
969.g2	969gH2gL7	Y71	-
969.g5	969gH2gL8(SG)		-

La actividad *in vitro* de cada anticuerpo se probó en el ensayo de inhibición de MCP-1. Se eligió el formato de ensayo que utiliza una titulación de CSF-1 con una concentración única del anticuerpo, ya que el formato permite la selección rápida de un panel grande de anticuerpos y resalta cualquier actividad diferencial de bloqueo del CSF-1R. En este ensayo, se detectó una liberación dependiente de la dosis de MCP-1 de los monocitos humanos primarios y la capacidad relativa de cada anticuerpo para bloquear la actividad del CSF-1R medida por la concentración de CSF-1 donde se liberó MCP-1. Se sembraron monocitos a 20,000 células por pocillo en medio en la presencia de una titulación de CSF-1 humano recombinante (series de dilución de 2 veces que comprendían 18 concentraciones, máximo 500 ng/ml). Se añadió una dosis única de 1 µg/ml del anticuerpo. Las células se incubaron durante 24 h y se recolectó el sobrenadante. La MCP-1 secretada se midió por ELISA. El ensayo de inhibición de MCP-1 reveló que los anticuerpos Ab969.g2 y Ab969.g7 conservaban una alta actividad de bloqueo de CSF-1R, con ambas entidades capaces de inhibir completamente la secreción de MCP-1 cuando se añadió CSF-1 a los monocitos a una concentración mayor de 100 ng/ml (Figura 14). En este ensayo, se detectó una pérdida clara de actividad para Ab969.g5, que solo podía inhibir la secreción de MCP-1 hasta una concentración de CSF-1 de 10 ng/ml. De manera similar, el anticuerpo Ab969.g9 mostró una actividad de bloqueo de CSF-1R reducida en comparación con Ab969.g2 y Ab969.g7.

La IC₅₀ de los injertos humanizados Ab969 seleccionados se midió en el ensayo MCP-1 para proporcionar una evaluación más completa de su capacidad relativa para inhibir la activación de monocitos mediada por CSF-1. Se consideró importante evaluar la actividad del anticuerpo utilizando varios donantes diferentes sin agrupar los monocitos de fuentes mixtas. La Tabla 9 muestra los valores de IC₅₀ de los anticuerpos acumulados a partir de los ensayos realizados en Ab969 utilizando 6 donantes diferentes.

Tanto el injerto humanizado Ab969.g2 como el Ab969.g7 exhiben una IC₅₀ relativa que es comparable con el anticuerpo quimérico Ab969.g0. En marcado contraste, Ab969.g5, exhibe una potencia mucho menor en el ensayo (relación media quimérica/IC₅₀ del injerto de 19,6).

Tabla 9

Anticuerpo	Restos del donante VK	Restos del donante VH	IC ₅₀ (ng/ml)							
			Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6	Media ± S.E.	Media quimérico/injerto
969.g0	N/A	N/A	31,0	5,7	59,4	41,7	20,9	7,1	27,6 +/- 8,5	N/A
969.g7	K38, Y71	-	46,3 (1,5)	6,1 (1.1)	N/A	N/A	N/A	N/A	26,2 +/- 14,2	1,3
969.g2	Y71	-	N/A	N/A	80,6 (1,4)	42,2 (1.0)	22,3 (1.1)	14,4 (2.0)	39,9 +/- 14.8	1,3
969.g5	-(SG)	-	667,1 (21,5)	100,3 (17.6)	N/A	N/A	N/A	N/A	383, 7 +/- 200, 4	19,6

25

v) Afinidad del panel del anticuerpo humanizado Ab696

La afinidad de cada injerto de anticuerpo humanizado Ab969 y el anticuerpo quimérico parental se midió mediante BIAcore (Tabla 10) donde se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se calcularon los valores medios. Los datos muestran que la afinidad (K_D) no parece cambiar durante el proceso de humanización desde la molécula quimérica (Ab969.g0) hasta el anticuerpo 'completamente humanizado' Ab969.g5. Sin embargo, la 'constante de asociación' del anticuerpo disminuye cuando la humanización avanza más allá del injerto Ab969.g2; tanto Ab969.g4 como Ab969.g5 poseen valores de K_a más bajos que los injertos anteriores. Además, el K_a para Ab969.g5 es más bajo que para Ab969.g4, lo que indica potencialmente que la mutación del sitio de isomerización de DG a SG reduce aún más la constante de asociación de los anticuerpos.

35

Tabla 10:

Anticuerpo injerto	Nombre del anticuerpo	Restos del donante de VK	Restos del donante de VH	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (μM)
969cHcL	969.0	N/A	N/A	2,83E+06	1,03E-05	3,6
				2,79E+06	1,10E-05	3,9
				2,68E+06	9,51E-06	3,6
				2,77E+06	1,03E-05	3,7
969gH1gL1	969.g1	K38, Y71, F87	A78	2,65E+06	8,47E-06	3,2
				2,57E+06	6,04E-06	2,4
				2,51E+06	9,88E-06	3,9
				2,58E+06	8,13E-06	3,2
969gH2gL1	969.g6	K38, Y71, F87	-	2,43E+06	8,84E-06	3,6
				2,44E+06	8,95E-06	3,7
				2,54E+06	6,63E-06	2,6
				2,47E+06	8,14E-06	3,3
969gH2gL4	969.g7	K38, Y71	-	2,57E+06	7,73E-06	3,0
				2,60E+06	9,41E-06	3,6
				2,52E+06	1,15E-05	4,6
				2,56E+06	9,55E-06	3,7
969gH2gL7	969.g2	Y71	-	2,46E+06	1,07E-05	4,3
				2,49E+06	8,39E-06	3,4
				2,44E+06	8,74E-06	3,6
				2,46E+06	9,28E-06	3,8
969gH2gL8	969.g4	-	-	1,99E+06	5,00E-06	2,5
				1,94E+06	6,65E-06	3,4
				1,97E+06	5,00E-06	2,5
				1,97E+06	5,55E-06	2,8
969gH2gL8(SG)	969.g5	-	-	1,71E+06	5,00E-06	2,9
				1,85E+06	7,03E-06	3,8
				1,84E+06	6,76E-06	3,7
				1,80E+06	6,26E-06	3,5

Conclusiones:

- 5 La prueba de un panel de injertos humanizados Ab969 en varios ensayos reveló que el resto de tirosina en la posición 71 (por ejemplo, Y71) dentro de la cadena ligera mejoró la actividad del anticuerpo. La sustitución de Y71 por ejemplo, una fenilalanina produce una reducción en la constante de asociación del anticuerpo (disminución de K_a) en relación con la molécula quimérica parental. Esto da como resultado una capacidad reducida del anticuerpo para bloquear la unión de CSF-1 a CSF-1R, revelada en un ensayo que controla la actividad de CSF-1R en monocitos humanos primarios (ensayo de inhibición de MCP-1).

10 **Ejemplo 4 - Estabilidad molecular del panel de Ab696 humanizado**

i) Estabilidad térmica

La estabilidad térmica (medida como la temperatura de fusión, T_m) se determinó mediante dos métodos independientes; un método monitorea el despliegue mediante la unión del tinte fluorescente a las superficies hidrófobas expuestas (método Thermofluor), el otro por calorimetría (DSC), una técnica ortogonal.

- 15 La T_m medida por Thermofluor para varios injertos del anticuerpo 969 (en PBS pH 7,4) se resume en la Tabla 11.

Tabla 11

Muestra	Media T _{m1} (°C)	S.D. T _{m1} (°C)	Media T _{m2} (°C)	S.D. T _{m2} (°C)
969.g2	80,5	0,6	65,6	0,4
969.g2	80,5	0,6	65,6	0,4
969.g5	79,7	0,6	64,7	0,2
969.g5 (pH 5,0)	82,7	0,1	59,9	0,5
969.g7	79,8	0,5	65,9	0,4
969.g9	79,4	0,5	65,8	0,5
IgG4 Control	66,4	0,8	ND	ND

Muestra T_{m1} Media (°C) T_{m1} S.D. (°C) T_{m2} Media (°C) T_{m2} S.D. (°C)

5 En general, el Fab 'T_m medido por Thermofluor sugiere que la mayoría de los 969 injertos son térmicamente más estables que el control de IgG4.

ii) El efecto de la concentración de la muestra en la propensión a la agregación.

Como predictor de la estabilidad de las muestras durante el almacenamiento, se estudió el efecto de la concentración de anticuerpos sobre la estabilidad en PBS pH 7,4.

Experimento 1:

10 Los anticuerpos se concentraron a >10 mg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días. Inmediatamente después de la concentración (T₀), 969.g7 apareció turbio y 969.g8 apareció ligeramente opalescente. En contraste, la muestra 969.g5 se consideró clara mediante inspección visual. Después de 5 días de incubación a temperatura ambiente, la muestra 969.g5 permaneció clara, mientras que la agregación de 969.g7 y 969.g8 había progresado aún más, cada una exhibiendo un fuerte precipitado.

15 A partir de este estudio, fue posible clasificar las muestras en orden de resistencia a la agregación en estas condiciones de la siguiente manera: 969.g5 > 969.g8 > 969.g7.

Experimento 2:

20 Antes de la concentración, las tres muestras de anticuerpos fueron transparentes mediante inspección visual, con la excepción de 969.g6 (a 4,68 mg/ml) que apareció opalescente. Tras la concentración a 16 mg/ml, se observó una precipitación de 969.g6 después de 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente y 4°C. Sin embargo, tanto 969.g1 como 969.g4 permanecieron claramente visibles. Después de 5 días de incubación adicional, fueron evidentes partículas grandes para la muestra 969.g1 tanto a temperatura ambiente como a 4°C. No se observó agregación para la muestra 969.g4 a temperatura ambiente o 4°C, según se evaluó por inspección visual.

25 A partir de este estudio, fue posible demostrar que 969.g6 tuvo cierta inestabilidad de agregación cuando se almacenó a baja concentración (4,68 mg/ml) en PBS pH 7,4. Además, esta precipitación se vio exacerbada por la concentración adicional de anticuerpos. El concentrado 969.g1 mostró una velocidad de agregación más lenta, mientras que el concentrado 969.g4 permaneció estable hasta 5 días a cualquier temperatura de almacenamiento. El orden de estabilidad a la agregación fue, por lo tanto: 969.g4 > 969.g1 > 969.g6.

Experimento 3: Anticuerpos 969.g2, 969.g5, 969.g7 y 969.g9

30 El análisis se realizó en las muestras inmediatamente después de la concentración (T₀), después de una incubación durante la noche y 5 días después de la concentración. Todas las muestras fueron transparentes mediante inspección visual antes de la concentración y no hubo evidencia de formación de partículas. Inmediatamente después de la concentración a 23,07 mg/ml, la muestra 969.g7 mostró precipitación como se había observado previamente en el experimento 1. Se observó una ligera opalescencia con 969.g9, que se hizo más evidente después de 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente o 4°C. Todos los otros 969 injertos aparecieron claros por inspección visual inmediatamente después de la concentración.

Después de 21 días de incubación, no hubo ningún cambio visible más del observado después de la incubación durante la noche a temperatura ambiente; ambos injertos 969.g7 y 969.g9 se agregaron como resultado de concentrar las muestras, mientras que no hubo una agregación visible obvia para las otras muestras.

40 En general, la muestra de 969.g2 mostró la menor tendencia a agregarse como resultado del aumento de la concentración. Esto también se correlacionó con la T_m más alta medida por Thermofluor.

Conclusión: Durante la expresión y purificación del panel de Ab969 humanizado, se hizo evidente que el aumento de

la concentración de anticuerpos por encima de 10 mg/ml daba como resultado una precipitación rápida de algunos injertos de anticuerpos humanizados. Específicamente, Ab969.g1, Ab969.g6 y Ab969.g7 formaron un precipitado, mientras que Ab969.g2, Ab969.g4 y Ab969.g5 no lo hicieron. Estos datos indican que una sustitución del resto de lisina en la posición 38 (K38), dentro de la cadena ligera para glutamina, mejora la estabilidad del anticuerpo cuando se concentra por encima de 10 mg/ml.

Ejemplo 5 Análisis in vitro de Ab969.g2

i) Secuencia de Ab969.g2

Ab969.g2 contiene el injerto de cadena ligera gL7 y el injerto de cadena pesada gH2. Las alineaciones de las secuencias de la región V del anticuerpo (donante) de rata con las secuencias de la región V de la línea germinal humana (aceptadora) se muestran en las Figuras 2A y 2B, junto con las secuencias humanizadas finales para el injerto de cadena ligera gL7 y el injerto de cadena pesada gH2.

Los restos del marco de la cadena pesada en el injerto gH2 son todos del gen de la línea germinal humana. El resto de glutamina en la posición 1 del marco de la cadena pesada humana se reemplazó con ácido glutámico (E1) para mejorar la expresión y purificación de un producto homogéneo, por ejemplo, mediante la conversión de glutamina a piroglutamato en el N-terminal de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

Los restos del marco de la cadena ligera en el injerto gL7 son todos del gen de la línea germinal humana, con la excepción del resto 71 (numeración de Kabat), donde se retuvo la tirosina del resto del donante. La retención de este resto proporcionó una potencia mejorada del anticuerpo humanizado como se muestra en el Ejemplo 3.

ii) Inhibición de la activación de monocitos humanos dependientes de IL-34

La actividad de Ab969.g2 en comparación con 969.g0 se evaluó en el ensayo de monocitos humanos dependientes de IL-34. El experimento se realizó utilizando dos donantes de monocitos separados y se calculó la IC₅₀ media para la inhibición de la estimulación de monocitos mediada por IL-34 (Tabla 12). No hubo diferencia significativa en la IC₅₀ entre Ab969.g2 y Ab969.g0.

Se sembraron monocitos humanos primarios a 20,000 células por pocillo en presencia de 100 ng/ml de IL-34 humana recombinante y una dosis de titulación del anticuerpo anti-CSF-1R (series de dilución de medio logaritmo que comprenden 16 concentraciones, máximo 10 µg/ml). Las células se incubaron durante 24 horas y se recolectó el sobrenadante. La MCP-1 secretada se midió mediante ELISA (R&D systems DY279). El gráfico muestra el porcentaje de inhibición de la producción de MCP-1 en comparación con el CSF-1 control solo.

Tabla 12

Anticuerpo	IC ₅₀ (ng/ml)		
	Donante 1	Donante 2	Media ± S.E.
969.g0	20,10	9,79	14,95 ± 5,17
969.g2	20,58	9,59	15,09 ± 5,51

iii) Unión de Ab969.g2 a SNPs de CSF-1R humano

Hay cuatro polimorfismos de nucleótido único (SNP) no sinónimos ubicados dentro del dominio de unión al ligando del gen de CSF-1R humano que se han informado en la población humana. Estos SNPs son V32G, A245S, H247P y V279M (Figura 1F). Cada variante de SNP de CSF-1R humano se generó y se expresó de forma estable en líneas celulares. La unión de Ab969.g2 a cada SNP se confirmó mediante citometría de flujo.

Ejemplo 6 Análisis de marcador farmacodinámico en mono cinomolgo

Se realizó un estudio farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) con el anticuerpo monoclonal humanizado anti-CSF-1R 969.g2 para demostrar la actividad farmacológica del anticuerpo en un primate no humano (mono cinomolgo). Los grupos de tres monos cinomolgos se administraron por vía intravenosa con una dosis única de 7 mg/kg (Grupo 1) o 1,5 mg/kg (Grupo 2) anticuerpo 969.g2. El anticuerpo fue bien tolerado sin signos clínicos adversos. Se tomaron muestras de suero en múltiples puntos de tiempo a lo largo del estudio de 25 días.

La concentración sérica de 969.g2 se midió mediante ELISA y se realizó un análisis farmacocinético (Tabla 13). Los parámetros de PK se calcularon utilizando el software WinNonlin.

t_{1/2} es la semi-vida del anticuerpo en suero.

C_{max} es la concentración máxima de anticuerpos en el suero.

AUC es el área bajo la curva (la integral de la curva de concentración-tiempo) y proporciona una indicación de la exposición total al medicamento.

Eliminación es el volumen de plasma eliminado del fármaco por unidad de tiempo.

Vol. Dist. es el volumen de distribución, el volumen aparente en el que se distribuye un medicamento.

- 5 Hubo una buena correlación entre los valores observados y predichos (el animal 2 es una excepción y se considera un valor atípico). La C_{max} fue proporcional a la dosis; AUC fue mayor que la dosis proporcional, lo que indica un aclaramiento más lento con la dosis más alta. La mayoría de 969.g2 se detectó en el suero.

Tabla 13

Animal	Dosis [mg/kg]	$t_{1/2}$ [h]	C_{max} [$\mu\text{g/mL}$]	AUC_{INF_obs} [$\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$]	Eliminación (Cl_{obs}) [mL/h/kg]	Vol distribución (V_{z_obs}) [mL/kg]
1	7	66,1	209,4	23184,5	0,30	28,8
2	7	30,3	117,6	6975,9	1,15	50,4
3	7	63,3	188,7	16761,0	0,42	38,1
4	1,5	27,9	36,1	1928,1	0,78	31,3
5	1,5	22,7	34,7	1668,6	0,90	29,5
6	1,5	27,1	36,6	1634,8	0,92	35,9

- 10 La ruta principal para la eliminación de CSF-1 es a través de la unión a su receptor afín, CSF-1R. Se espera que el bloqueo de la unión de CSF-1 a CSF-1R aumente la concentración sérica de CSF-1 a través de la prevención de la depuración mediada por el receptor; un fenómeno que se ha observado en modelos murinos. Por lo tanto, un aumento en la concentración sérica de CSF-1 es un marcador farmacodinámico de compromiso e inhibición de CSF-1R.

- 15 Ambas dosis de 969.g2 instigaron una acumulación rápida y significativa de suero CSF-1. El efecto fue dependiente de la dosis, con la dosis de 7 mg/kg que dio una concentración máxima de CSF-1 de aproximadamente 10 veces mayor que la dosis de 1,5 mg/kg. Se observó una relación farmacocinética/farmacodinámica con la normalización de los niveles de CSF-1 después de la eliminación del anticuerpo. Los niveles de CSF-1 volvieron a los valores iniciales al final del estudio para ambos grupos de tratamiento. Los resultados se muestran en las Figuras 15a y 15b.

- 20 La Figura 15a muestra la concentración de CSF-1 en muestras de suero tomadas de monos cinomolgos tratados con una dosis intravenosa única de 7 mg/kg de Ab969.g2. La concentración sérica de CSF-1 se midió en dos ensayos independientes. El gráfico muestra la concentración media de CSF-1 para los tres animales en el Grupo 1 (7 mg/kg) con error estándar (cuadrados). También se muestra la concentración sérica media de Ab969.g2 (círculos).

- 25 La Figura 15b muestra la concentración de CSF-1 en muestras de suero tomadas de monos cinomolgos tratados con una dosis intravenosa única de 1.5 mg/kg de Ab969.g2. La concentración sérica de CSF-1 se midió en dos ensayos independientes. El gráfico muestra la concentración media de CSF-1 para los tres animales en el Grupo 2 (1.5 mg/kg) con error estándar (cuadrados). También se muestra la concentración sérica media de Ab969.g2 (círculos).

- 30 Hay dos poblaciones principales de monocitos de monos cinomolgos humanos circulantes; (i) CD14+ CD16- monocitos "clásicos" y (ii) CD14+ CD16+ "no clásicos" o "monocitos" residentes. Los modelos murinos han demostrado que los macrófagos de tejidos residentes, incluidos los TAMs, se derivan de la población de monocitos no clásica. Además, los monocitos no clásicos se derivan de una diferenciación adicional de la población de monocitos clásicos. Las poblaciones de monocitos circulantes en monos cinomolgos a los que se les administró 969.g2 se monitorearon mediante citometría de flujo de cuatro colores de sangre completa. La citometría de flujo se realizó utilizando anticuerpos anti-cyno-CD45-PerCP, anti-HLA-DR-APC humano, CD14-FITC anti-humano (clon My4) y CD16-PE anti-humano (clon 3G8). Las puertas se establecieron utilizando el control de isotipos apropiado para cada anticuerpo. Los monocitos clásicos se definieron como CD45+ HLA-DR+ CD14+ CD16-. Los monocitos no clásicos se definieron como CD45+ HLA-DR+ CD14+ CD16+.

- 40 Ambas dosis de 969.g2 instigaron un agotamiento gradual de los monocitos no clásicos CD14+ CD16+ durante la primera semana del estudio. El agotamiento casi total de los monocitos no clásicos fue causado por la dosis de 7 mg/kg. La reducción de monocitos no clásica con dosis de 7 mg/kg y 1,5 mg/kg pareció alcanzar su punto máximo al día 4, con números que volvieron a la normalidad para el día 11. Los resultados se muestran en la Figura 15c. Los gráficos de barras muestran el número medio de monocitos CD14+ CD16+ no clásicos circulantes en los puntos de tiempo a lo largo del estudio (días (D) 0, 1, 4, 18 y 25) con error estándar. La concentración media de suero CSF-1 también se representa con un error estándar.

Este ejemplo confirmó que (i) el anticuerpo 969.g2 era capaz de unirse a CSF-1R y bloquear la unión de CSF-1 en el

mono cinomolgo, (ii) demostró la actividad farmacológica del anticuerpo 969.g2 en un modelo de primate no humano, (iii) demostró que el anticuerpo 969.g2 agotó selectivamente la población no clásica de monocitos cinomolgo *in vivo* - la población de monocitos se cree que es precursora de macrófagos asociados a tumores, y (iv) que la concentración sérica de CSF-1 era adecuada como biomarcador para medir la actividad de 969.g2.

5 **Ejemplo 7: Inhibición del crecimiento del xenoinjerto de cáncer de mama MCF-7**

El anticuerpo 969.g2 no es capaz de unirse al ratón CSF-1R. Por consiguiente, se llevaron a cabo estudios *in vivo* con ratones utilizando un anticuerpo anti-murino CSF-1R Ab535 para mostrar la utilidad de Ab969.g2 para tratar el cáncer y la fibrosis. Se ha demostrado que Ab535 tiene propiedades y actividad comparables a Ab969.g2 en varios experimentos *in vitro*.

- 10 Se ha demostrado que Ab535 inhibe la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 en el Ejemplo 2 iii), tiene una afinidad comparable en el Ejemplo 2 iv) y no activa la internalización de CSF-1R en el Ejemplo 2 vii).

Como en el estudio *in vivo* sobre Ab535, el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama MCF-7 *in vivo* se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 15 El estudio midió la eficacia terapéutica del anticuerpo Ab535, administrado por vía subcutánea (s.c.), frente a un anticuerpo control, un control positivo y el vehículo control en ratones atímicos inmunodeficientes que llevan trasplantes subcutáneos del xenoinjerto de cáncer de mama humano MCF-7. La inhibición del crecimiento tumoral se utilizó como parámetro terapéutico. El cáncer de mama humano MCF-7 se usó como modelo de xenotrasplante subcutáneo en ratones inmunodeficientes NMRI: nu/un. La línea celular MCF-7 se obtuvo del banco de tumores del National Cancer Institute (USA). Para su uso, las células se cultivaron *in vitro* en medio RPMI 1640 + FCS al 10%. Las células se tomaron de cultivos sub-confluentes y se inocularon subcutáneamente en ratones. Se inició el tratamiento cuando el tamaño del tumor era palpable (4-10 mm). Los compuestos de ensayo y el vehículo control se suministraron s.c. tres veces por semana. El control positivo se administró por vía intravenosa una vez al día en los días 24, 33 y 40. Los volúmenes de inyección se ajustaron individualmente al peso corporal en el momento de la inyección. Los diámetros tumorales se midieron tres veces por semana con un calibrador. Los volúmenes tumorales se calcularon de acuerdo con $V = (\text{longitud} \times (\text{ancho})^2) / 2$. Para el cálculo del volumen tumoral relativo (RTV), los volúmenes en cada día de medición se relacionaron al día del primer tratamiento. En cada día de medición, se calcularon la mediana y la media de los volúmenes tumorales por grupo y también los valores de la mediana del grupo tratado con respecto al control (T/C) en porcentaje.

- 20 Los resultados se muestran en la Figura 16. El Ab535 mostró un efecto antitumoral dependiente de la dosis. Ambas dosificaciones del anticuerpo IgG de ratón control no indujo una inhibición del crecimiento tumoral. Los volúmenes relativos de tumores fueron comparables con el vehículo control y el control positivo ocasionó la inhibición del crecimiento tumoral.

Conclusión: el anticuerpo de prueba Ab535 indujo un efecto antitumoral estadísticamente significativo en el xenoinjerto MCF-7 de cáncer de mama humana a la dosis más alta (30 mg/kg/día).

35 **Ejemplo 8: Inhibición del crecimiento del cáncer de próstata ortotópico PC-3**

La eficacia antitumoral y antimetastática del anticuerpo Ab535 también se probó utilizando un modelo de cáncer PC-3 *in vivo* en próstata ortotópica. La línea celular PC-3 se modificó genéticamente para expresar de forma continua la luciferasa, lo que permite llevar a cabo el análisis de imágenes por bioluminiscencia *in vivo*, lo que deja monitorear el crecimiento del tumor *in vivo* y realizar análisis de metástasis *ex vivo* en órganos seleccionados.

- 40 El estudio consistió en 6 grupos experimentales, cada uno con 11 (Grupo 5) o 12 (todos los demás Grupos) ratones macho NMRI desnudos después de la aleatorización. Al día 0, las células PC-3 se implantaron ortotópicamente en la próstata de todos los ratones macho NMRI desnudos participantes. Al día 3, se verificó la aparición del crecimiento tumoral mediante formación de imágenes por bioluminiscencia *in vivo*. Al día 8, se realizó una segunda formación de imágenes por bioluminiscencia *in vivo* y se asignaron al azar los animales portadores de tumores en seis grupos de acuerdo con los resultados de la imagen, de manera que la intensidad de bioluminiscencia media y por lo tanto el tamaño tumoral fueron similares en cada grupo. Al día siguiente (día 9), se inició la terapia. Los animales de los grupos 2 y 3 recibieron 30 y 10 mg/kg del anticuerpo control, respectivamente, 3 veces por semana s.c. hasta el día 42. Los animales de los grupos de tratamiento 4 y 5 recibieron 30 y 10 mg/kg del anticuerpo Ab535, respectivamente, 3 veces por semana s.c. hasta el día 42. Los animales del grupo 1 representaron el vehículo control y el vehículo se recibió (PBS) 3 veces por semana s.c. hasta el día 42. Los animales del grupo 6 representaron el control positivo y recibieron 360 mg/kg del control i.v. una vez por semana durante cuatro semanas (en los días 10, 17, 24 y 31). Durante el curso del estudio, el crecimiento de los tumores PC-3 implantados ortotópicamente se monitoreó *in vivo* los días 3, 8 (asignación al azar), 15, 22, 29, 36 y 43 utilizando imágenes de bioluminiscencia.

- 55 Se realizó una necropsia al final del estudio. Se determinaron el peso y el volumen del tumor primario. Los órganos seleccionados (hígado, bazo y pulmón) se recolectaron, una porción de cada uno se fijó en formalina y el resto se analizó con respecto al patrón de metástasis a través de imágenes de bioluminiscencia utilizando un ensayo de luciferasa *in vitro*. Además, el fémur de una pierna y la misma porción de la columna lumbar se recolectaron para

analizar el patrón de metástasis en los huesos utilizando el ensayo de luciferasa *in vitro*.

La señal de bioluminiscencia *in vivo* se compuso a partir del tumor primario y de las metástasis (formación de imagen de cuerpo entero). Con base en estos datos, se podría calcular una curva de crecimiento tumoral para todos los grupos (Figura 17). El desarrollo tumoral fue homogéneo en todos los grupos de estudio hasta la asignación al azar y el inicio del tratamiento. A continuación, el Grupo 1 tratado con el vehículo control, así como los dos Grupos 2 y 3 del anticuerpo control RTE11 mostraron un crecimiento tumoral regular. Se pudo observar una reducción altamente significativa del crecimiento tumoral medida *in vivo* al día 43 para el control positivo (Grupo 6). El anticuerpo Ab535, administrado a 30 o 10 mg/kg, respectivamente (Grupos 4 y 5), condujo a una reducción significativa del crecimiento tumoral cuando se controla utilizando imágenes de bioluminiscencia *in vivo*.

Los volúmenes de tumores primarios y los pesos húmedos se determinaron durante la necropsia al día 44. El control positivo (Grupo 6), condujo a una reducción altamente significativa tanto del volumen como del peso del tumoral primario. El anticuerpo Ab535 se administró a 30 mg/kg (Grupo 4), se pudo observar una reducción significativa tanto del volumen como del peso del tumor primario. Cuando se administró Ab535 a 10 mg/kg (Grupo 5), la reducción del volumen tumoral fue notable, pero menor que la mostrada por el Grupo 4. No se pudo observar una eficacia antitumoral significativa en el caso del anticuerpo control.

Utilizando la técnica de formación de imágenes por bioluminiscencia, se midieron las actividades de luciferasa del tumor primario después de la necropsia. Los resultados obtenidos fueron comparables a los resultados de los hallazgos de la necropsia y la curva de crecimiento *in vivo*. El control positivo (Grupo 6) condujo a una reducción altamente significativa de la actividad luciferasa del tumor primario. El anticuerpo Ab535, administrado a 30 mg/kg (Grupo 4), condujo a una reducción significativa de la actividad luciferasa del tumor primario, mientras que la reducción fue menor cuando se administró Ab535 a 10 mg/kg (Grupo 5). No se pudo encontrar una reducción significativa de la actividad luciferasa para el anticuerpo control.

Se analizaron varios órganos adicionales (hígado, bazo, pulmón, fémur y una parte de la columna lumbar) utilizando la técnica de formación de imágenes por bioluminiscencia *ex vivo*. En el caso del control positivo, se pudieron mostrar reducciones significativas de la actividad de la luciferasa para el fémur y la columna lumbar, mientras que la reducción de la señal fue apenas inferior a la significativa en el caso del hígado y el bazo. En el caso del anticuerpo Ab535, administrado a 30 mg/kg (Grupo 4), la reducción de la actividad de la luciferasa fue significativa para el hígado y evidente para todos los demás órganos. El anticuerpo control (Grupos 2 y 3) no produjo ninguna reducción de la actividad luciferasa en todos los órganos analizados. En conclusión, se pudo demostrar una eficacia antitumoral significativa para el anticuerpo Ab535 en este modelo tumoral, combinado con una eficacia antimetastática evidente.

Ejemplo 9: Efecto del anticuerpo anti-CSF-1R en un modelo de fibrosis pulmonar *in vivo* inducida por Bleomicina

La bleomicina es un antibiótico aislado por primera vez de *Streptomyces verticillatus* y se ha utilizado como quimioterapéutico para varios tipos de cáncer. El modelo de bleomicina de la fibrosis pulmonar es un modelo bien establecido y se usó esencialmente como se describe en Madtes, DK et al, 1999, Am J Respir Cell Mol Biol, 20, 924-34. El protocolo detallado se puede encontrar en la siguiente referencia Morschl, E., Molina, J. G., Volmer, J., Mohsenin, A., Pero, R. S., Hong, J. S., Kheradmand, F., Lee, J. J. y Blackburn, M. R. (2008), la señalización del receptor de adenosina A3 influye en la inflamación pulmonar y la fibrosis. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 39: 697-705.

Todos los ratones utilizados fueron ratones hembra C57Blk6 de tipo silvestre (20 g) adquiridos en Harlan Labs. Se usó una instilación de corte intra-traqueal (IT) donde los ratones se anestesiaron con avertina y se realizó una traqueotomía para instilar una dosis de bleomicina de 3,5 unidades en 50 µl de solución salina o 50 µl de solución salina sola como control. El tratamiento de esta manera conduce a una fase inflamatoria que alcanza su punto máximo al día 7 después de la exposición a la bleomicina y una fase fibrótica que es máxima al día 21 después de la exposición. El efecto del anticuerpo Ab535 se investigó cuando el anticuerpo se dosificó solo en la fase fibrótica del modelo y se administró por vía subcutánea a 30 mg/kg, tres veces por semana desde el día 9-21. Los animales se sacrificaron el día 21 y las lecturas incluyeron el análisis histopatológico de los pulmones, la celularidad del fluido BAL (lavado broncoalveolar) y la medición del colágeno soluble en el fluido BAL. Se realizó un análisis histopatológico para evaluar el daño pulmonar utilizando un sistema de puntuación Ashcroft modificado para determinar la gravedad de la fibrosis pulmonar (Hubner RH et al, 2008, Biotechniques 44: 507-17). Los pulmones extirpados se inflaron con formalina al 10% a 25 cm de presión y se procesaron a través de una serie de alcoholes y xileno, se embebieron en parafina y las secciones de tejido se desparafinaron antes del procesamiento y la tinción con Trichrome de Masson.

La cantidad de colágeno soluble en el fluido BAL se evaluó utilizando un kit de ensayo Sircol comercialmente disponible siguiendo las instrucciones del fabricante.

El efecto sobre la población de macrófagos en el fluido BAL se determinó utilizando preparaciones de cytopspin. Se centrifugaron las alícuotas de células BAL sobre portaobjetos de microscopio, se tiñeron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

Se encontró que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo anti-CSF-1R, Ab535, con una dosis iniciada el día 9, resultó en una fibrosis pulmonar inducida por bleomicina muy reducida. Tanto la severidad como la extensión de la

fibrosis se redujeron significativamente. Los ratones tratados habían reducido la producción de colágeno, mejoraron la patología fibrótica y mejoraron la protección de la barrera pulmonar.

La Figura 18a muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la concentración de colágeno BALF en comparación con el tratamiento con el control de isotipos.

5 La Figura 18b muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipos, lo que demuestra que los ratones tratados con Ab535 tuvieron una mejora en patología fibrótica.

10 La Figura 18c muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la concentración de albúmina en el suero en comparación con el tratamiento con el control de isotipos, lo que demuestra que mejoró la permeabilidad vascular de los ratones tratados con Ab535.

La Figura 19 muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de pulmones de animales tratados con solución salina control, bleomicina más control de isotipos y bleomicina más Ab535. Los animales tratados con Ab535 tenían una fibrosis pulmonar muy reducida en comparación con los animales tratados con bleomicina, control de isotipos.

15 **Ejemplo 10. Efecto del anticuerpo anti-CSF-1R en un modelo de fibrosis pulmonar en ratón deficiente en adenosina desaminasa**

20 La adenosina es un potente nucleósido de señalización, cuyos niveles aumentan cuando las células sufren estrés o se dañan y se produce una amplia variedad de respuestas cuando la adenosina se asocia con sus receptores acoplados a proteínas G específicos. La adenosina desaminasa (ADA) es una enzima del catabolismo de la purina que convierte la adenosina en inosina. Se han generado ratones knockout a ADA y se ha demostrado que tienen mayores niveles de adenosina en suero, así como en tejidos tales como el riñón, el hígado y el pulmón (Blackburn, MR et al, 1998, J Biol Chem, 273 (9): 5093-5100). Estos ratones presentan características de enfermedad pulmonar crónica tales como la destrucción alveolar, inflamación de las vías respiratorias y producción excesiva de moco que se asocian con aumento de los niveles de adenosina en el pulmón (Blackburn MR et al, 2000, J Exp Med, 192: 159-70). Los efectos son tales que los ratones mueren a las tres semanas de edad debido a la dificultad respiratoria. La administración de ADA exógena utilizando un régimen de dosis bajo reduce los niveles de adenosina y prolonga la vida útil de estos ratones, lo que permite desarrollar un modelo de fibrosis pulmonar (Chunn JL et al, 2005, J Immunol 175: 1937-46, Pedrosa M et al, 2011, PLoS One, 6(7): e22667). En este modelo, la elevación crónica de los niveles de adenosina se asocia con un aumento de los mediadores pro-fibróticos, incluido el TGF α -1 en los pulmones, aumento del depósito de colágeno en el tejido pulmonar y aumento de la patología fibrótica de los pulmones. Para investigar el efecto de moléculas con potencial antifibrótico, los ratones deficientes en ADA se mantienen en un régimen de ADA exógeno de dosis baja durante varias semanas, el tratamiento con ADA se detiene y se administra el agente antifibrótico potencial.

35 El efecto del anticuerpo anti-CSF-1R Ab535 se investigó en el modelo de fibrosis pulmonar en ratón knockout a ADA. En este modelo, los ratones deficientes en enzimas se mantuvieron en terapia con enzimas ADA desde el día 1 hasta el día 21 después del nacimiento. Se preparó un conjugado ADA-polietilenglicol (PEG) (Young HW et al, 2004, J Immunol 173: 1380-89) y se administraron inyecciones intramusculares a los días 1, 5, 9, 13 y 17 postnatales (0,625, 1,25, 2,5, 2,5 y 2,5 unidades respectivamente), seguido de 5 unidades inyectadas por vía intraperitoneal al día 21. No se administró más enzima después del día 21. Se administró Ab535 dosificado por vía subcutánea a 30 mg/kg, en un volumen de 100 ml tres veces/semana desde el día 25 (después del parto) hasta que los animales se sacrificaron el día 42.

45 Los animales se sacrificaron el día 42 y las lecturas incluyeron análisis histopatológico de los pulmones, celularidad del fluido BAL y cuantificación de colágeno soluble en fluido BAL. El análisis histopatológico se realizó para evaluar el daño pulmonar utilizando un sistema de puntuación Ashcroft modificado para determinar la gravedad de la fibrosis pulmonar (Hubner et al, 2008, Biotechniques 44: 507-17). Los pulmones extirpados se inflaron con formalina al 10% a 25 cm de presión y se procesaron a través de una serie de alcoholes y xileno, se embebieron en parafina y las secciones de tejido se desparafinaron antes del procesamiento y la tinción con Trichrome de Masson.

La cantidad de colágeno soluble en fluido BAL también se evaluó utilizando un kit de ensayo Sircol comercialmente disponible siguiendo las instrucciones del fabricante.

50 El efecto sobre la población de macrófagos en el fluido BAL se determinó utilizando preparaciones de cytospin. Se centrifugaron las alícuotas de células BAL sobre portaobjetos de microscopio, se tificaron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

55 Se encontró que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo anti-CSF-1R Ab535 redujo significativamente la fibrosis pulmonar en ratones deficientes en ADA. Los ratones tratados tuvieron una producción reducida de colágeno, mejoraron la patología fibrótica y mejoraron la función y protección de la barrera pulmonar.

La Figura 20a muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535

redujo la concentración de colágeno BALF en comparación con el tratamiento con el control de isotipos.

La Figura 20b muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipos, lo que demuestra que los ratones tratados con Ab535 habían mejorado la patología fibrótica.

- 5 La Figura 20c muestra que el tratamiento de ratones deficientes de ADA con fibrosis pulmonar inducida con Ab535 redujo la concentración de albúmina en el suero en comparación con el tratamiento con el control de isotipos, lo que demuestra que mejoró la permeabilidad vascular de los ratones tratados con Ab535.

La Figura 20d muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida que reciben Ab535 redujo los números de macrófagos en el fluido BAL.

- 10 La Figura 21 muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de los pulmones de ratones normales (ADA+) y ratones deficientes de ADA con fibrosis pulmonar inducida (ADA-), ambos tratados con el control de isotipos o Ab535. En los ratones ADA-, los animales tratados con Ab535 tuvieron una fibrosis pulmonar muy reducida en comparación con el control de isotipos.

- 15 En consecuencia, se ha demostrado en dos modelos de ratones con fibrosis pulmonar que el tratamiento con un anticuerpo anti-CSF-1R puede tratar de manera eficaz la enfermedad fibrótica.

Lista de secuencias

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> ANTICUERPOS

<130> G0181-PCT

- 20 <150> GB1315487.7

<151> 30-08-2013

<160> 39

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

- 25 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias CA019_969 Ab CDR-L1

- 30 <400> 1

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

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

- 35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias CA019_969 Ab CDRL2

<400> 2

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp
1 5

- 40 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

- 45 <223> Secuencias CA019_969 Ab CDR-L3

<400> 3

ES 2 733 735 T3

Leu Gln Asp Ser Glu Tyr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencias CA019_969 Ab CDR-H1
 <400> 4
 Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly
 1 5 10
 10 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Secuencias CA019_969 Ab CDR-H2
 <400> 5
 Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 16
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencias CA019_969 Ab CDR-H3
 <400> 6
 Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe
 25 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Región Rat Ab 969 VL
 <400> 7
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Pro His Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Glu Ser

ES 2 733 735 T3

<211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Región Rat Ab 969 VL con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 10
 atgggtgtcc ccactcagct cttgggtgtg ttgctgctgt ggattacaga tgccatatgt 60
 gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtctcc 120
 atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac gataatttag cgtggtacca gaagaagcca 180
 ggaaaatctc ctcacctcct catctattat gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca 240
 cggttcagtg gcagtggtgc tggcacacag tattctctca aatcaacag cctggaatct 300
 gaagatgctg cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac gttcgggtgga 360
 ggcaccaagc tggaattgaa a 381

<210> 11
 <211> 125
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región Rat Ab 969 VH

<400> 11
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Ala
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Leu Thr Asn Val His Thr Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125

<210> 12
 <211> 375
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Región Rat Ab 969 VH

<400> 12

ES 2 733 735 T3

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
 acttgcaactt tctctggggtt ttcactgacc acctatggta tgggtgtggg ctggattcgt 120
 cagccttcag ggaagggctct ggagtggctg gcaaacattt ggtgggatga tgataagtat 180
 tacaatccat ctctgaaaaa ccggctcaca atctccaagg acacctcaa caaccaagca 240
 ttcctcaagc tcaccaatgt acacacttca gattctgcca catactactg tgctcggata 300
 gggccgatta aatacccgcac ggccccctac cggctactttg acttctgggg cccaggaacc 360
 atggtcaccg tctcgc 375

<210> 13

<211> 144

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región Rat Ab 969 VH con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 13

Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

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

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

10

Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn
 85 90 95

Asn Gln Ala Phe Leu Lys Leu Thr Asn Val His Thr Ser Asp Ser Ala
 100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 130 135 140

<210> 14

<211> 432

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región Rat Ab 969 VH con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 14

ES 2 733 735 T3

atggacaggc ttacttcctc attcctactg ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtctcag 60
 gttactctga aagagtctgg cctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 120
 tgcactttct ctgggttttc actgaccact tatggtatgg gtgtgggctg gattcgtcag 180
 ccttcagggg agggctctgga gtggctggca aacatttggg gggatgatga taagtattac 240
 aatccatctc tgaaaaaccg gtcacaatc tccaaggaca cctccaaca ccaagcattc 300
 ctcaagctca ccaatgtaca cacttcagat tctgccacat actactgtgc tcggataggg 360
 ccgattaat acccgacggc cccctaccgg tactttgact tctggggccc aggaaccatg 420
 gtcaccgtct cg 432

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Región-969 gL7 V

<400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

10

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 16
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Región-969 gL7 V

<400> 16

ES 2 733 735 T3

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga cagggtgaca 60
 atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 120
 ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 180
 cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 240
 gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 300
 ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 17

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región-969 gL7 V con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 17

10 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser
 100 105 110
 Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 18

<211> 381

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región-969 gL7 V con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 18

ES 2 733 735 T3

```
atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga cgcaagatgc 60
gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtgggaga cagggtgaca 120
atcacctgtc tggcctccga ggatattctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 180
ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 240
cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 300
gaggatthtg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 360
ggcaccaaag tggaaatcaa g 381
```

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera 969 gL7 (V + constante)

<400> 19

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

10

ES 2 733 735 T3

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtgggaga cagggtgaca 60
 atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 120
 ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 180
 cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 240
 gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 300
 ggcaccaaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggccccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtgtgtg gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 21

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera 969 gL7 (V + constante) con secuencia de señal subrayada y en *itálica*

<400> 21

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

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

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

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

10

ES 2 733 735 T3

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 702

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera 969 gL7 (V + constante) con secuencia de señal subrayada y en *itálica*

<400> 22

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga cgcaagatgc 60

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtgggaga cagggtgaca 120

atcacctgtc tggcctccga ggatattctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 180

ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 240

cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 300

gaggatthttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtgt 360

ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

10 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 702

<210> 23

<211> 125

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región-969 gH2 V

ES 2 733 735 T3

<400> 23

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

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

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

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

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 24

<211> 375

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región 969 gH2 V

<400> 24

gaagtgacac tcaaggagtc tggaccgct ctggtgaaac caaccxaaac actcactttg 60

acatgtactt ttagtggctt ctcatgact acctatggaa tgggcgtggg atggatcaga 120

cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac 180

10 tataaccggt ccctgaaaaa ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg 240

gtgctgacca tgacaaatat ggatcccgtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcatt 300

ggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg ccaagggaca 360

atggttactg tctcgt 375

<210> 25

<211> 144

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región-969 gH2 V con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 25

ES 2 733 735 T3

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

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

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 130 135 140

<210> 26

<211> 432

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Región-969 gH2 V con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 26

10 atggagtggg cctgggtggt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggt ccactccgaa 60

gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa cccaacact cactttgaca 120

tgtactttta gtggcttctc attgactacc tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag 180

ccacctggca aggctctgga atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat 240

aaccctccc tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtggtg 300

ctgacatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcg cgcattgggt 360

cccataaagt accctacggc accttaccga tatttcgact tttggggcca agggacaatg 420

gttactgtct cg 432

<210> 27

<211> 453

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada 969 gH2 (V + constante - hu IgG4P)

<400> 27

ES 2 733 735 T3

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
 100 105 110
 Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 130 135 140
 Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

ES 2 733 735 T3

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Gly Lys
 450

<210> 28

<211> 1966

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada 969 gH2 (V + constante - hu IgG4P, exones subrayados)

<400> 28

gaagtgacac tcaaggagtc tggaccogct ctggtgaaac caacccaaac actcactttg	60
acatgtactt ttagtggcct ctcatgtact acctatggaa tgggcgtggg atggatcaga	120
cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac	180
tataaccogt ccttgaaaaa ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aatcaagtg	240
gtgctgacca tgacaaatat ggatcccgtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcatt	300
ggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg ccaagggaca	360
atggttactg tctcgagcgc ttctacaaag ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc	420
tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggcaagga ctacttcccc	480
gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg	540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctgagcagcg tggtgaccgt gccctccagc	600
agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg	660
gacaagagag ttggtgagag gccagcacag ggagggaggg tgtctgctgg aagccaggct	720
cagccctcct gcctggagcg accccggctg tgcagccca gccagggca gcaaggcatg	780
ccccatctgt ctctcaccg ggaggcctct gaccaccca ctcatgcca gggagaggtg	840
cttctggatt tttccaccag gctccgggca gccacaggct ggatgccct accccaggcc	900
ctgcgcatc aggggcaggt gctgctca gacctgcaa gagccatc cgggaggacc	960
ctgccctga cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc actccctcag ctgagacacc	1020
ttctctctc ccagatctga gtaactccca atcttctctc tgcagagtcc aaatattggtc	1080
ccccatgcc accatgcca ggtaagccaa cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg	1140

10

ES 2 733 735 T3

acaggtgcc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacgcatcc 1200
 acctccatct ctctctcagc acctgagttc ctggggggac catcagtctt cctggtcccc 1260
 ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtggtggtg 1320
 gacgtgagcc aggaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 1380
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1440
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1500
 aacaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggacccac 1560
 ggggtgcgag ggccacatgg acagaggtca gctcggccca ccctctgccc tgggagtgac 1620
 cgctgtgcca acctctgtcc ctacagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc 1680
 cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt 1740
 ctaccccagc gacatcgccc tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa 1800
 gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca ggctaaccgt 1860
 ggacaagagc agtggtgagc aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct 1920
 gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaa 1966

<210> 29

<211> 472

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada 969 gH2 (V + constante - hu IgG4P) con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 29

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

10

ES 2 733 735 T3

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

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 130 135 140

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

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 165 170 175

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 210 215 220

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

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 305 310 315 320

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 340 345 350

ES 2 733 735 T3

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415

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

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 435 440 445

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

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 465 470

<210> 30

<211> 2023

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada 969 gH2 (V + constante - hu IgG4P, exones subrayados) con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 30

atggagtggg cctgggtggt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggt cactccgaa 60
 gtgacctca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa ccaaact cactttgaca 120
 tgtactttta gtggcttctc attgactacc tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag 180
 ccacctggca aggctctgga atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat 240
 aaccctccc tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggt 300
 ctgaccatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcg cgcattgggt 360
 cccataaagt accctacggc accttaccga tatttcgact tttggggcca agggacaatg 420
 gttactgtct cgagcgcttc taaaagggc ccatccgtct tcccctggc gccctgctcc 480
 aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
 10 ccggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt 600

ES 2 733 735 T3

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
 ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caagggtggac 720
 aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggaggggtgt ctgctggaag ccaggctcag 780
 ccctcctgcc tggacgcacc cgggctgtgc agccccagcc cagggcagca aggcattgcc 840
 catctgtctc ctaccccgga ggctctgac cccccactc atgccaggg agagggtctt 900
 ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggtgga tgcccctacc ccaggccctg 960
 cgcatacagg ggcagggtgt gcgctcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg 1020
 cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa actctccact ccctcagctc agacaccttc 1080
 tctcctccca gatctgagta actcccaatc ttctctctgc agagtccaaa tatgggtcccc 1140
 catgcccacc atgccagggt aagccaaccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca 1200
 ggtgccctag agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cgcattccacc 1260
 tccatctctt cctcagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttctt gttcccccca 1320
 aaaccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac 1380
 gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 1440
 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1500
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1560
 aaagcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gaccacggg 1620
 gtgcgagggc cacatggaca gaggctcagct cggccccacc tctgccctgg gagtgaccgc 1680
 tgtgccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc 1740
 atcccaggag gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgctggtca aaggcttcta 1800
 ccccagcgac atcgcctgg agtgggagag caatgggagc cgggagaaca actacaagac 1860
 cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc taaccgtgga 1920
 caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca 1980
 caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaa 2023

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marco acceptor VK1 2-1-(1) 012 JK4 humano

<400> 31

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

1

5

10

15

10

ES 2 733 735 T3

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

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

Tyr Ala 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 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 32

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marco acceptor VK1 2-1-(1) 012 JK4 humano

<400> 32

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

10 <210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Marco acceptor VH2 3-1 2-70 JH3 humano

<400> 33

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

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

ES 2 733 735 T3

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ile Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser

<210> 34

<211> 342

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marco aceptor VH2 3-1 2-70 JH3 humano

<400> 34

caggtcacct tgaaggagtc tggctctgcg ctggtgaaac ccacacagac cctcacactg 60

acctgcacct tctctgggtt ctcaactcagc actagtggaa tgcgtgtgag ctggatccgt 120

cagccccag ggaaggcct ggagtggctt gcacgcattg attgggatga tgataaatc 180

tacagcacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240

gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300

gcttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct ct 342

10 <210> 35

<211> 972

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R

<400> 35

Met Gly Pro Gly Val 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

ES 2 733 735 T3

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
 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

ES 2 733 735 T3

Leu 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

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

ES 2 733 735 T3

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

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> 36

<211> 277

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R

<400> 36

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

10

ES 2 733 735 T3

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

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
 275

- 5
- <210> 37
 - <211> 49
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R

ES 2 733 735 T3

<400> 37

Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr Ile
1 5 10 15

His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala Leu
20 25 30

Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val Gln
35 40 45

Lys

<210> 38

<211> 493

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R (SNP V32G, A245S, H247P, V279M, posición subrayada)

<400> 38

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

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

ES 2 733 735 T3

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
 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 His 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

ES 2 733 735 T3

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
405 410 415

Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp
420 425 430

Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr
435 440 445

Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr
450 455 460

Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile
465 470 475 480

Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
485 490

<210> 39

<211> 512

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de dominio extracelular CSF-1R humano

<400> 39

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

10

ES 2 733 735 T3

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

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

ES 2 733 735 T3

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
 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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CSF-1R que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 27 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en SEQ ID NO: 19.
2. El anticuerpo anti-CSF-1R según la reivindicación 1, que tiene una molécula efectora o informadora unida a él.
- 5 3. El anticuerpo anti-CSF-1R según la reivindicación 1 o 2, que tiene una afinidad de unión para CSF-1R humano de 10 pM o menor que 10 pM.
4. Una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y ligera(s) de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN según la reivindicación 4.
- 10 6. El vector según la reivindicación 5, en donde el vector comprende las secuencias dadas en SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 20.
7. Una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión según la reivindicación 6.
8. Un proceso para la producción del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 7 y aislar el anticuerpo.
- 15 9. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; en donde la composición farmacéutica comprende opcionalmente otros ingredientes activos.
10. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según la reivindicación 11 para uso como un medicamento.
- 20 11. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según la reivindicación 11 para el tratamiento o la profilaxis del cáncer o de una enfermedad fibrótica.
12. El anticuerpo para uso según la reivindicación 11, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer colorrectal, leucemia, linfoma, cáncer de piel, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer astrocítico, cáncer endometrial, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer renal, 25 cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas y cáncer de ovario.
13. El anticuerpo para uso según la reivindicación 11, en donde la enfermedad fibrótica se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística, fibrosis renal, cirrosis hepática, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis 30 sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, infarto del miocardio, escleroderma y artrofibrosis.

FIGURA 1A

secuencias CA019_969 Ab

CDR-L1

LASEDIYDNLA SEQ ID NO:1

CDRL2

YASSLQD SEQ ID NO:2

CDR-L3

LQDSEYPWT SEQ ID NO:3

CDR-H1

GFSLTTYGMGVG SEQ ID NO:4

CDR-H2

NIWDDDKYYNPSLKN SEQ ID NO:5

CDR-H3

IGPIKYPTAPYRYFDF SEQ ID NO:6

FIGURA 1B

Ab 969 región VL de rata SEQ ID NO:7

DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY DNLAWYQKKP GKSPHLLIYY
 ASSLQDGVPS RFGSGSGTQ YSLKINSLES EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG
 GTKLELK

Ab 969 región VL de rata SEQ ID NO:8

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga
 aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac gataatttag
 cgtggtacca gaagaagcca ggaaaatctc ctcacctcct catctattat
 gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg gcagtggatc
 tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct gaagatgctg
 cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac gttcggtgga
 ggcaccaagc tgaattgaa a

Ab 969 región VI de rata con secuencia señal subrayada y en itálicas SEQ ID NO:9

MGVPTQLLVL LLLWITDAIC DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY
 DNLAWYQKKP GKSPHLLIYY ASSLQDGVPS RFGSGSGTQ YSLKINSLES
 EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG GTKLELK

Ab 969 región VL de rata con secuencia señal subrayada y en itálicas SEQ ID NO:10

atgggtgtcc ccactcagct cttgggtgtg ttgctgctgt ggattacaga
tgccataatgt gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat
 ctctgggaga aactgtctcc atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac
 gataatttag cgtggtacca gaagaagcca ggaaaatctc ctcacctcct
 catctattat gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca cggttcagtg
 gcagtggatc tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct
 gaagatgctg cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac
 gttcggtgga ggcaccaagc tgaattgaa a

Ab 969 región VH de rata SEQ ID NO:11

QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPSGKGLEWL
 ANIWWDKDY YNPSLKNRLT ISKDTSNQA FLKLTNVHTS DSATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYDFWGPMT MVTVS

Ab 969 región VH de rata SEQ ID NO:12

caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctccagac
 cctcagctcg acttgcaatt tctctgggtt ttcactgacc acttatggta
 tgggtgtggg ctggattcgt cagccttcag ggaaggtct ggagtggctg
 gcaaacattt ggtgggatga tgataagtat tacaatccat ctctgaaaaa
 ccggtcaca atctccaagg acacctcaa caaccaagca ttcctcaagc

ES 2 733 735 T3

tcaccaatgt acacacttca gattctgcca catactactg tgctcggata
gggcccgatta aatacccgac ggccccctac cggctacttg acttotgggg
cccaggaacc atggtcaccg tctcg

Ab 969 región VH de rata con secuencia señal subrayada y en itálicas SEQ ID NO:13

MDRLTSSFLL LIVPAYVLSQ VTLKESGPGI LQPSQTLSLT CTFSGFSLTT
YGMGVGWIRQ PSGKGLEWLA NIWDDDKYY NPSLKNRLTI SKDTSNNQAF
LKLTNVHTSD SATYYCARIG PIKYPTAPYR YDFWGPSTM VTVS

Ab 969 región VH de rata con secuencia señal subrayada y en itálicas SEQ ID NO:14

atggacaggc ttacttctc attctactg ctgattgtcc ctgcatatgt
cctgtctcag gttactctga aagagtctgg cctgggata ttgcagccct
cccagaccct cagtctgact tgcactttct ctgggttttc actgaccact
tatgggatgg gtgtgggctg gattcgtcag ccttcagga agggctctga
gtggctggca aacatttggg gggatgatga taagtattac aatccatctc
tgaaaaaccg gctcacaatc tocaaggaca cctccaaca ccaagcattc
ctcaagctca ccaatgtaca cacttcagat totgccacat actactgtgc
tcggataggg cggattaat acccgacggc cccctaccgg tactttgact
tctggggccc aggaaccatg gtcaccgtct cg

FIGURA 1C

969 gL7 región V SEQ ID NO:15

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
 ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
 GTKVEIK

969 gL7 región V SEQ ID NO:16

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga
 cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg
 catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
 gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
 cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggatthtg
 ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtgg
 ggcaccaaag tggaaatcaa g

969 gL7 región V con secuencia señal subrayada y en itálicas SEQ ID NO:17

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY
 DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YLTISSLQP
 EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG GTKVEIK

969 gL7 región V con secuencia señal subrayada y en itálicas SEQ ID NO:18

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
cgcaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca
 gtgtgggaga cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac
 gataacctgg catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct
 gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
 gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
 gaggatthtg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
 cttcgggtgg ggcaccaaag tggaaatcaa g

969 gL7 de cadena ligera (V + constante) SEQ ID NO:19

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
 ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEN

969 gL7 de cadena ligera (V + constante) SEQ ID NO:20

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga
 cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg

ES 2 733 735 T3

catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
gctcctcttc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
cgggaocggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtggt
ggcaccaaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggccccc atctgtcttc
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg
gctgctgtaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaa
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

969 gL7 de cadena ligera (V + constante) con secuencia señal subrayada y en itálicas
SEQ ID NO:21

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDVRT ITCLASEDIY
DNLAWYQKPK GKAPKLLIYY ASSLQDGVPS RPSGSGSGTD YTLTISSLQP
EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYISLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEV

969 gL7 de cadena ligera (V + constante) con secuencia señal subrayada y en itálicas
SEQ ID NO:22

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
cgcaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaage ctgagtgcca
gtgtgggaga cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac
gataacctgg catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct
gatttattat gctcctcttc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
cttccgggtggt ggcaccaaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggccccc
ctgtcttcctat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc
tctgtttgtg gctgctgtaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca
gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca
cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac
ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt
gt

FIGURA 1D

969 gH2 región V SEQ ID NO:23

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
 ANIWWDKDY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYDFWQGT MVTVS

969 gH2 región V SEQ ID NO:24

gaagtgacac tcaaggagtc tggaccgct ctggtgaaac caacccaaac
 actcactttg acatgtactt ttagtggtt ctcattgact acctatggaa
 tgggctggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
 gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccgct ccctgaaaaa
 cggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg gtgctgacca
 tgacaaatat ggatcccgct gacaccgcaa cctactactg cgcccgatt
 ggtcccataa agtaccctac ggcacctac cgatatttgc acttttgggg
 ccaagggaca atggttactg tctcg

969 gH2 región-V con secuencia señal subrayada y en *itálicas* SEQ ID NO:25

MEWSWVFLFF *LSVTTGVHSE* VTLKESGPAL VKPTQTLTLT CTFSGFSLTT
 YGMGVGWIRQ PPGKALEWLA NIWWDKDY NPSLKNRLTI SKDTSKNQVV
 LTMTNMDPVD TATYYCARIG PIKYPTAPYR YDFWQGTMT VTVS

969 gH2 región-V con secuencia señal subrayada y en *itálicas* SEQ ID NO:26

atggagtgg *cctgggtgtt* *tctgttcttc* *ctgagtgtga* *ccaccgggg*
ccactccgaa gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa
 cccaaacact cactttgaca tgtacttta gtggcttctc attgactacc
 tatggaatgg gcggtgggatg gatcagacag ccacctggca aggcctgga
 atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat aaccctgcc
 tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggtg
 ctgaccatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcgc
 ccgatttgtt cccataaagt accctacggc accttaccga tatttgcact
 tttggggcca agggacaatg gttactgtct cg

969 gH2 de cadena pesada (V + contante - hu IgG4P) SEQ ID NO:27

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
 ANIWWDKDY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
 GPIKYPTAPY RYDFWQGT MVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA
 LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVTVPS
 SLGKTYTCN VDHKPSNTKV DKRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKARGQPR

ES 2 733 735 T3

EPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSGGSF FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL
LGK

969 GH2 de cadena pesada (V + constante - hu IgG4P, exones subrayados) SEQ ID NO:28

gaagtgacac tcaaggagtc tggaccgcgt ctggtgaaac caacccaac
actcactttg acatgtactt ttagtggtt ctcatgact acctatggaa
tgggcgtggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccogt cctgaaaaa
ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aatcaagtg gtgctgacca
tgacaaatat ggatccogt gacaccgaa cctactactg cgcccgatt
ggtcccataa agtaccctac ggcacctac cgatatttcg acttttgggg
ccaagggaca atggttactg tctcgagcgc ttctacaaag ggccatccg
tctccccct ggcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc
ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccggtga cgggtcgtg
gaactcaggc gccctgacca gggcgtgca caccttccc gctgtctac
agtcctcagg actctactcc ctccagcagc tggtgaccgt gccctccagc
agcttgggca cgaagacctc cacctgcaac gtatgcaca agccagcaa
caccaaggtg gacaagagag ttggtgagag gccagcacag ggaggaggg
tgtctgctgg aagccaggt cagccctct gcttgaagc accccgctg
tgcagcccca gccagggca gcaaggcatg ccccatctgt ctctcacc
ggaggcctct gaccaccca ctcatgcca gggagaggg cttctggatt
ttccaccag gctccgggca gccacaggct ggatgcccct acccaggcc
ctgcgcatag aggggcaggt gctgcgctca gacctgcaa gagccatct
cgaggagacc ctgcccctga cctaagccca ccccaaggc caaactctcc
actcctcag ctccagacc ttctctctc ccagatctga gtaactcca
atctctctc tgcagagtcc aatatggtc ccccatgccc acctgccc
gtaagccaa cccaggctc gccctccagc tcaaggcggg acaggtgcc
tagagttagc tgcattcagg gacaggccc agccgggtgc tgacgatcc
acctccatct ctctcagc acctgagttc ctggggggac catcagttt
cctgttccc ccaaaacca aggacctct catgatctcc cggaccctg
aggctcagtg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagacc cgaggtccag
ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc
gggggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg
tctgcacca ggaactgctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc
aacaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa acctctcca aagccaaagg
tgggacccac ggggtgogag ggccacatgg acagaggtea gctcgccca
ccctctgcc tgggagtgac cgctgtgcca acctctgtcc ctacagggca
gccccgagag ccacaggtg acaccctgccc cccatcccag gaggagatga
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc
gacatgcocg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaca
gaccacgct cccgtgctg actccgagc ctcttcttc ctctacagca
ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt ctctcatgc
tccgtgatgc atgaggtct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc
cctgtctctg ggtaaa

ES 2 733 735 T3

969 GH2 de cadena pesada (V + constante - hu IgG4P) con secuencia señal subrayada y en *itálicas*
 SEQ ID NO:29

MEWSNVFLFF LSVTTGVHSE VTLKESGPAL VKPTQTLTLT CTFSGFSLTT
 YGMGVGWIRQ PPGKALEWLA NIWDDDKYY NPSLKNRLTI SKDTSKNQVV
 LTMTNMDPVD TATYYCARIG PIKYPTAPYR YDFWQOGTM VTVSSASTKG
 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
 CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL GK

969 GH2 de cadena pesada (V + constante - hu IgG4P, exones subrayados) con secuencia señal subrayada
 e *itálicas* SEQ ID NO:30

atggagtggc cctgggtggt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccgggt
ccactccgaa gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaccaa
cccaaacact cactttgaca tgtacttta gtggcttctc attgactacc
tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag ccacctggca aggcctctga
atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat aaccogtccc
tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggtg
ctgaccatga caaatatgga tcccgttgac accgcaacct actactgcgc
ccgcattggt ccataaaagt accctacggc acctaccga tatttcgact
tttggggcca agggacaatg gttactgtct cgagcgcttc tacaaggggc
ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac
agccgcctg ggtgctctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg
tgctgtggaa ctcaggcgc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccgct
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc
ccagcaaac caaggtggac aagagagtgt gtgagaggcc agcacagga
gggaggggtg ctgctggaag ccaggctcag cctcctgcc tggacgcacc
ccggtctgtc agccccagcc cagggcagca aggcattgcc catctgtctc
ctcaccggga ggcctctgac caccacctc atgcccagg agagggtctt
ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgcccctacc
ccaggccctg cgcatacagg ggcaggtgct gcgctcagac ctgccaagag
ccatatccgg gaggacctg cccctgacct aagcccacc caaaggccaa
actctccact cctcagctc agacacctc tctctccca gatctgagta
actcccaatc ttctctctgc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc
atgccagggt aagccaaacc aggcctcgc ctccagctca agcggggaca
ggtgccctag agtagcctgc atccaggac agccccagc cgggtgctga
cgcattccacc tccatctctt cctcagcacc tgagttctg gggggaccat
cagtcttctt gttccccca aaaccaagg acactctcat gatctcccg
accctgagg tcacgtcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccocga
ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga

ES 2 733 735 T3

caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa
ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag
ccaaaggtgg gacccacggg gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct
ogggccacc tetgacctg gagtgaccg tgtgccaacc tetgtcccta
cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca cctgcccc atcccaggag
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggcca aaggcttcta
ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca
actacaagac cacgcctccc gtgctggaact ccgaecgctc cttcttctc
tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt
ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga
gcctctcct gtctctgggt aaa

FIGURA 1E

Marco aceptor humano VK1 2-1-(1) O12 JK4 SEQ ID NO:31

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQSSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA
ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVEIK

Marco aceptor humano VK1 2-1-(1) O12 JK4 SEQ ID NO:32

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga
cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa
attggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct
gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagtg gcagtggatc
tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct gaagattttg
caacttacta ctgtaacag agttacagta cccctctcac ttloggggga
gggaccaagg tggagatcaa a

Marco aceptor humano VH2 3-1 2-70 JH3 SEQ ID NO:33

QVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL S TSGMRVSWIR QPPGKALEWL
ARIDWDDDKF YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
AFDIWGQGTMTVTVS

Marco aceptor humano VH2 3-1 2-70 JH3 SEQ ID NO:34

caggtcacct tgaaggagtc tggctctgog ctggtgaaac ccacacagac
cctcacactg acctgcaact tctctggggt ctcactcagc actagtggaa
tgcggtgtgag ctggatcogt cagccccag ggaaggcoct ggagtggctt
gcacgcattg attgggatga tgataaatc tacagcacat ctctgaagac
caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg gtccttacia
tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata
gcttttgata tctggggcca agggacaatg gtcaccgtct ct

FIGURA 1F

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R SEQ ID NO: 35

MGPGVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNGSVEW
 DGPPSPHWTLYSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY
 VKDPPARPNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVRGRPLMR
 HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSS IRLKVQKVIP
 GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFVDFLQHN NTKLAIPQOS
 DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQGHSTS MFFRVVESAY
 LNLSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSHQPEPK
 LANATTKDXY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY
 PPEVSVIWF INGSGTLLCA ASGYPQPNVT WLQCSGHTDR CDEAQLQVW
 DDPYEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS VSGSGWAFIP
 ISAGAHTHP DEFLFTPVV ACMSIMALL LLLLLLLYKY KQKPKYQVRW
 KIIESYEGNS YTFIDPTQLP YNEKWEFPRN NLQFGKTLGA GAFGKVVEAT
 AFGLGKEDAV LKVAVKMLKS TAHADKEAL MSELKIMSHL GQHENIVNLL
 GACTHGGPVL VITEYCCYGD LLNFLRRKAE AMLGPSLSPG QDPEGGVYK
 NIHLEKKYVR RDSGFSSQGV DTYVEMRPVS TSSNDSFSEQ DLDKEDGRPL
 ELRDLLHFSS QVAQGMFLA SKNCIHRDVA ARNVLLTNGH VAKIGDFGLA
 RDIMNDSNYI VKGNARLPVK WMAPESI FDC VYTVQSDVWS YGILLWEIFS
 LGLNPYPGIL VNSKFYKLVK DGYQMAQPAF APKNIYSIMQ ACWALEPTHR
 PTFQQICSF QEQAQEDRRE RDTNLPSSS RSGSGSSSS ELEEESSSEH
 LTCCEQGDIA QPLLQPNYQ FC

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R SEQ ID NO: 36

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNVSEWVWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
 CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPPARPNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDVPVLEAGVSLVRVRGRP
 LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
 LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFVDFLQHNNTKLAIPQOSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
 YSCVASNVQGHSTSMFFRVV

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R SEQ ID NO: 37

MRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQK

Secuencia de aminoácidos para CSF-1R SEQ ID NO: 38 (SBP V32G, A245S, H247P, V279M, posición subrayada)

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNVSEWVWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
 CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPPARPNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDVPVLEAGVSLVRVRGRP
 LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSIRLKVQKVIPGPPALTLVPAE
 LVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFVDFLQHNNTKLAAIHQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
 YSCVASNVQGHSTSMFFRVVESAYLNLSSEQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFNWTYL
 GPFSDHQPEPKLANATTKDXYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPE
 VSVIWFINGSGTLLCAASGYPQPNVTWLQCSGHTDR CDEAQLQVWDDPYEVLSQEPFHKVT
 VQSLTVETLEHNQTYECRAHNSVSGSGWAFIPISAGAHTHPPE

FIGURA 2A

CADENA LIGERA Injerto 969

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105																																																																											
Ligera 969	D	I	Q	M	T	Q	S	P	R	L	S	A	S	L	G	E	T	V	E	I	N	C	L	A	S	E	D	I	V	D	N	L	A	V	Q	K	K	P	K	S	P	H	L	L	T	T	A	S	S	L	Q	D	V	P	S	R	F	S	G	S	S	G	T	Q	V	S	K	N	S	L	E	S	E	D	A	A	T	F	F	C	L	Q	S	R	T	P	N	T	F	G	G	T	K	L	E	L	K
VK1 2-1-(1) O12	D	I	Q	M	T	Q	S	P	R	L	S	A	S	V	G	D	R	V	I	T	T	C	A	N	Q	S	I	S	T	L	A	V	Q	K	P	K	A	P	L	L	T	T	A	S	S	L	Q	D	V	P	S	R	F	S	G	S	S	G	T	Q	F	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	S	R	T	P	N	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K					
969 gL7	D	I	Q	M	T	Q	S	P	R	L	S	A	S	V	G	D	R	V	I	T	T	C	L	A	S	E	D	I	V	D	N	L	A	V	Q	K	P	K	A	P	L	L	T	T	A	S	S	L	Q	D	V	P	S	R	F	S	G	S	S	G	T	Q	F	L	T	I	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	S	R	T	P	N	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K		

Legenda

- 969 = secuencia variable de cadena ligera de rata
- 969 gL7 = injerto humanizado de la cadena variable ligera utilizando VK1 2-1-(1) O12 plus linea germinal de humano JK4 como el marco aceptor.
- CDRs se muestran en negritas/subrayadas
- El resto donante se muestra en negritas/italicas y resaltado: Y7I

ES 2 733 735 T3

FIGURA 2B

CADENA PESADA Injerto 969

	1	5	10	15	20	25	30	ab	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	abc	85	90	95		105	1			
Pesada 969	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCTFS GPSLTTYCMVCG WIRQPSGKGLEWLAN NIWDDDKYINPSLKN RRLTISKDTSNNQAFILKLTNVHTSDSATYYCAR IGPIKYPTAPYRYDFE WGPGTMVTS																											
VH2 3-1 2-70	QVTLKESGPAVKPTQTLTLCTFS GPSLSTGMRVSW IRQPPGKALEWLAN RIWDDDKFYSLKTR RLTISKDTSKNQVVLMTNNDPVDATYYCARI----- AFDVMG QGTMTVTS																											
969gH2	EVTLKESGPAVKPTQTLTLCTFS GPSLTTYCMVCG WIRQPPGKALEWLAN NIWDDDKYINPSLKN RRLTISKDTSKNQVVLMTNNDPVDATYYCAR IGPIKYPTAPYRYDFE WGPGTMVTS																											

Leyenda

969 = Secuencia variable de cadena pesada de rata

969gH2 = Injerto humanizado de la cadena pesada variable 969 utilizando VH2 3-1 2-70 plus la línea germinal humana como el marco aceptor

Las CDRs se muestran en negritas/subrayadas

FIGURA 3

SEQ ID NO: 39

MGPGLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNGSVEW DGPPSPHWTL YSDGSSSILS
 TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPAAPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL
 VVRVGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA
 ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVLQHN NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA
 SNVQGHKSTS MFFRVVESAY LNLSSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK
 LANATTKDXY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWF INGSGTLLCA
 ASGYPQPNVT WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS
 VGSGSWAFIP ISAGAHTHP DE

FIGURA 4

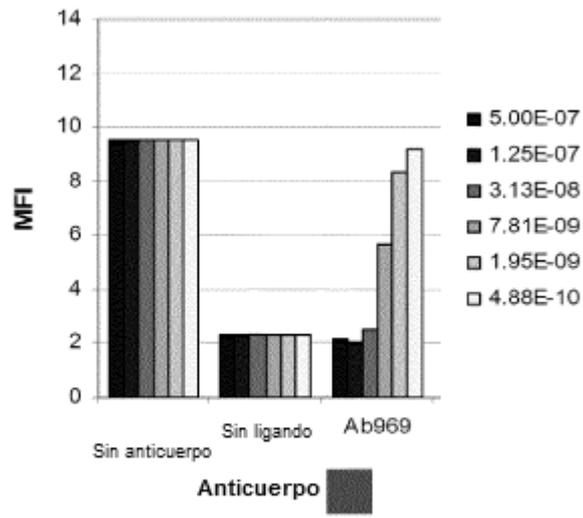


FIGURA 5a

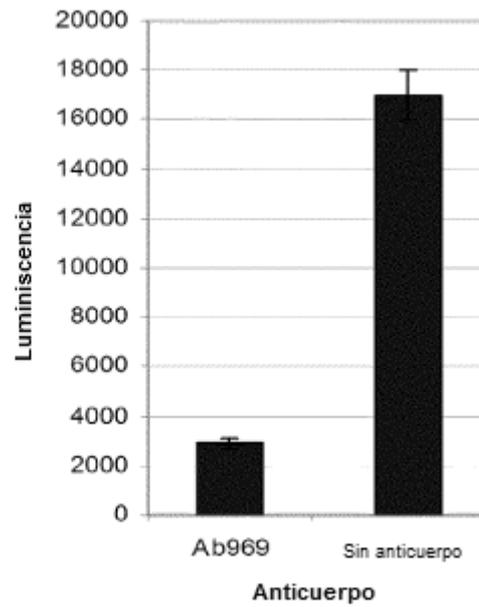


FIGURA 5b

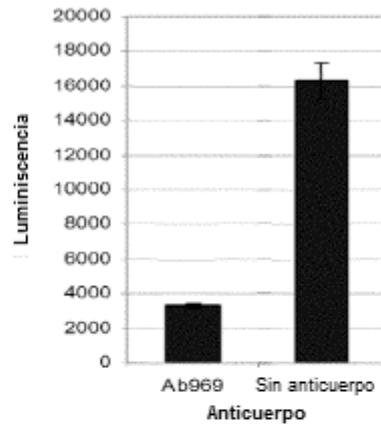


FIGURA 6

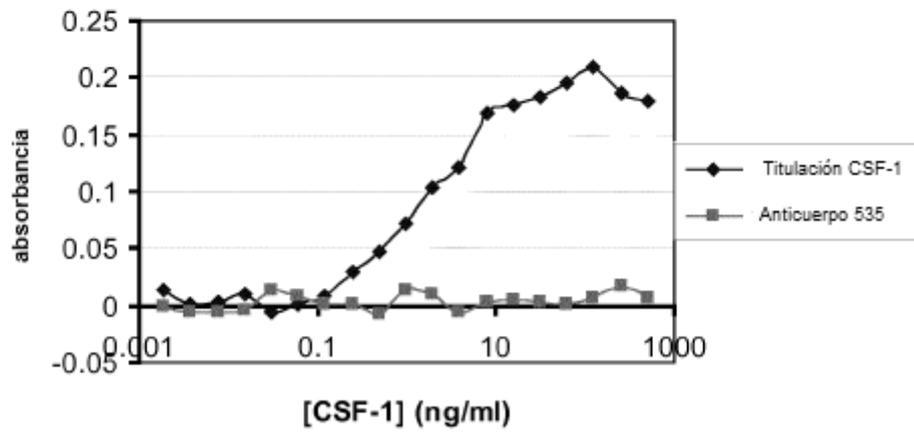


FIGURA 7

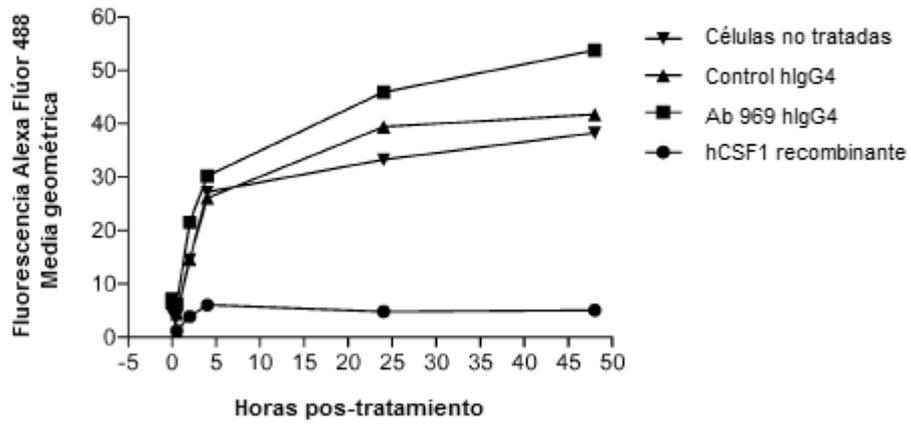


FIGURA 8

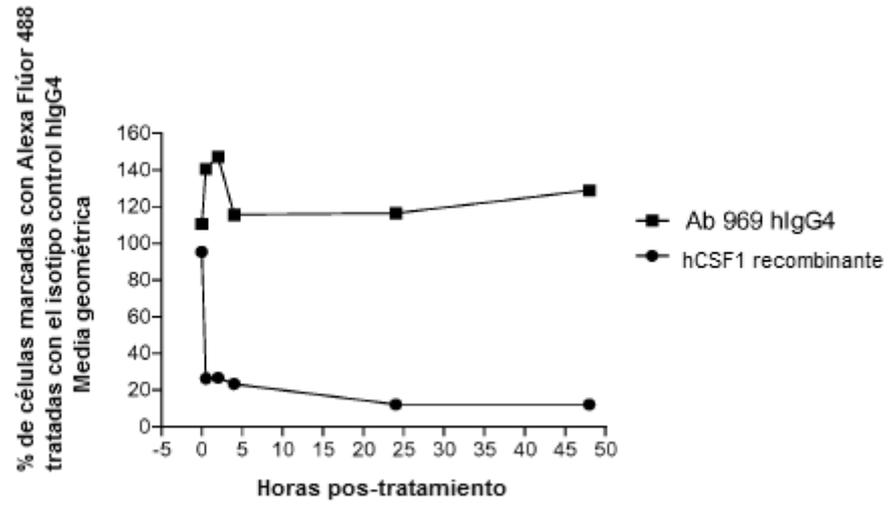


FIGURA 9

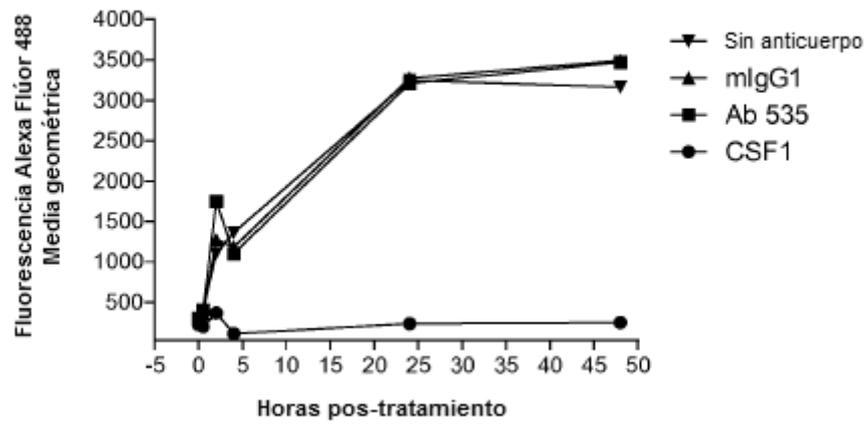


FIGURA 10



FIGURA 11

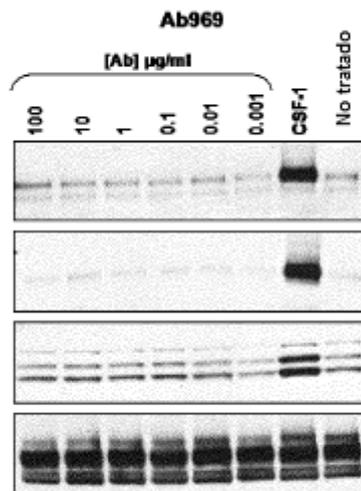


FIGURA 12

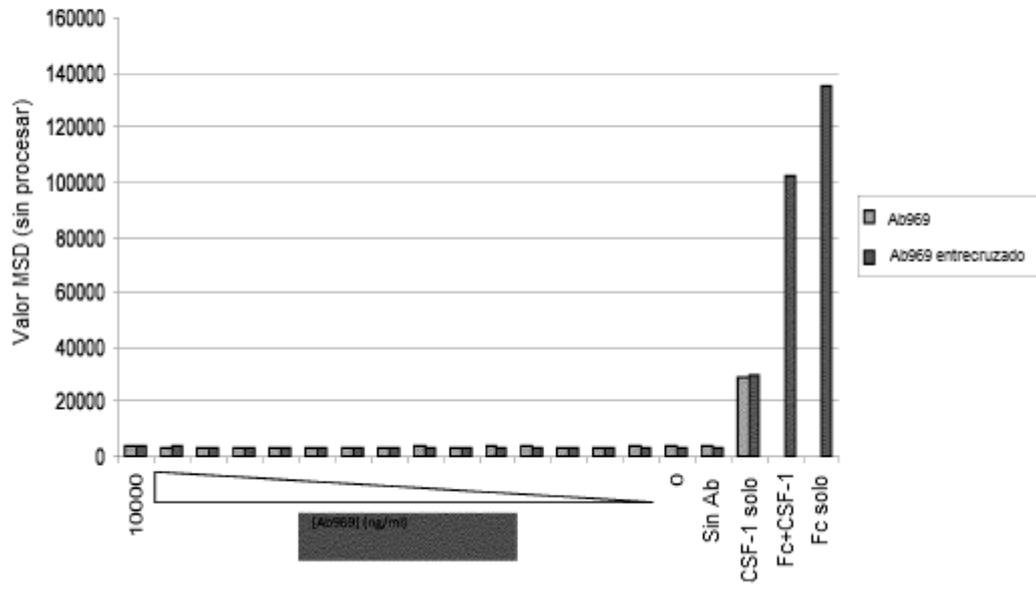


FIGURA 13

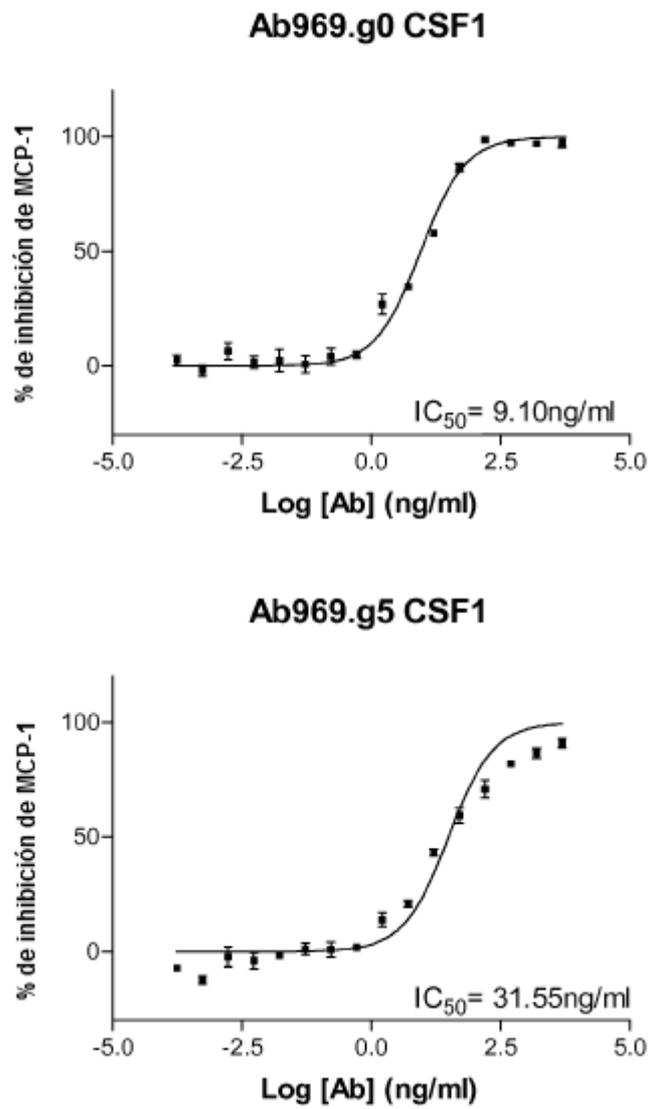


FIGURA 14

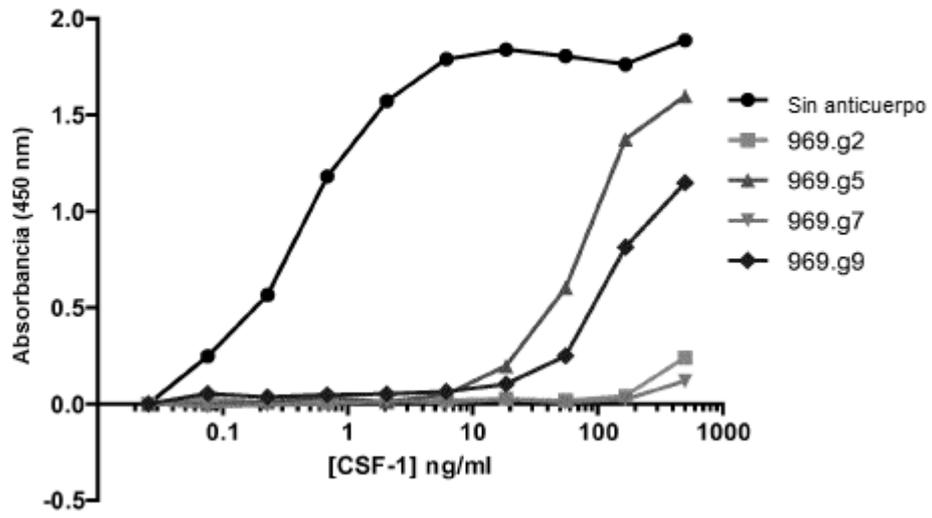


FIGURA 15a

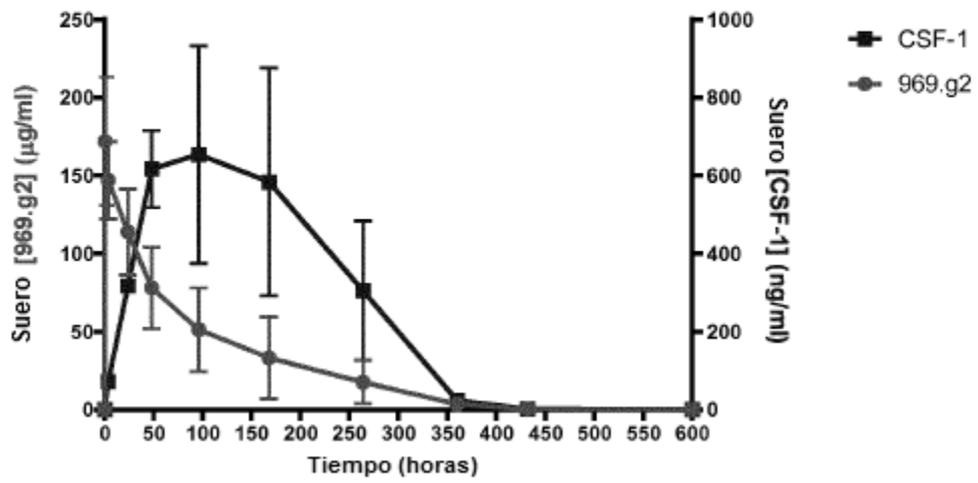


FIGURA 15b

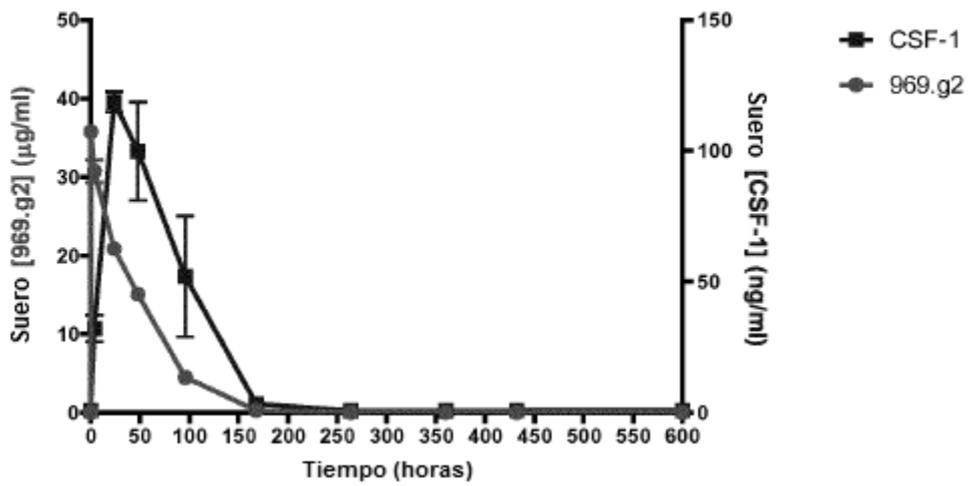


FIGURA 15c

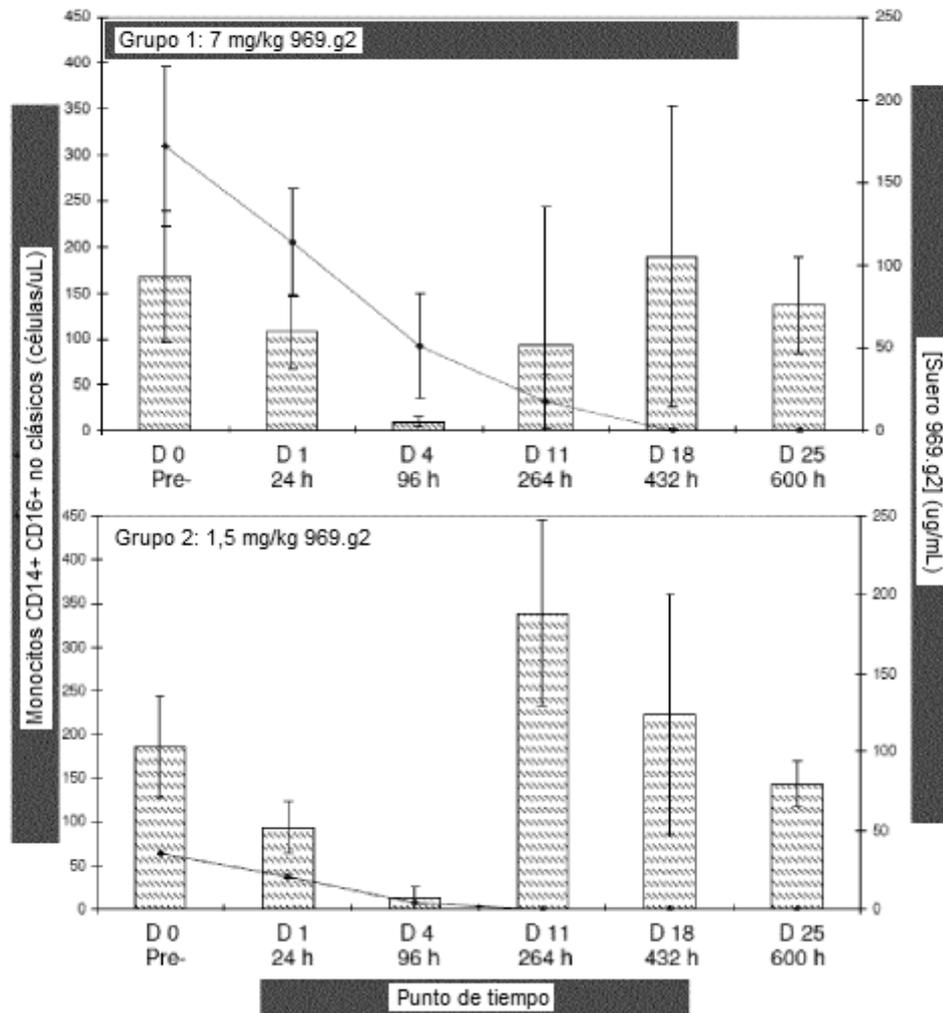


FIGURA 16

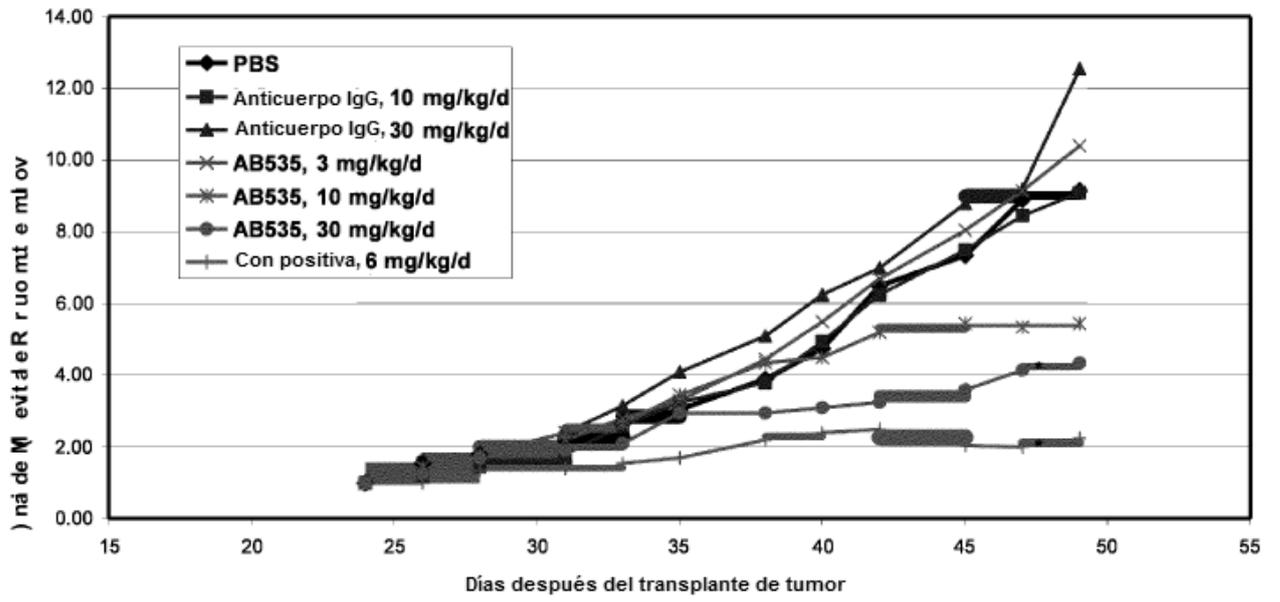


FIGURA 17

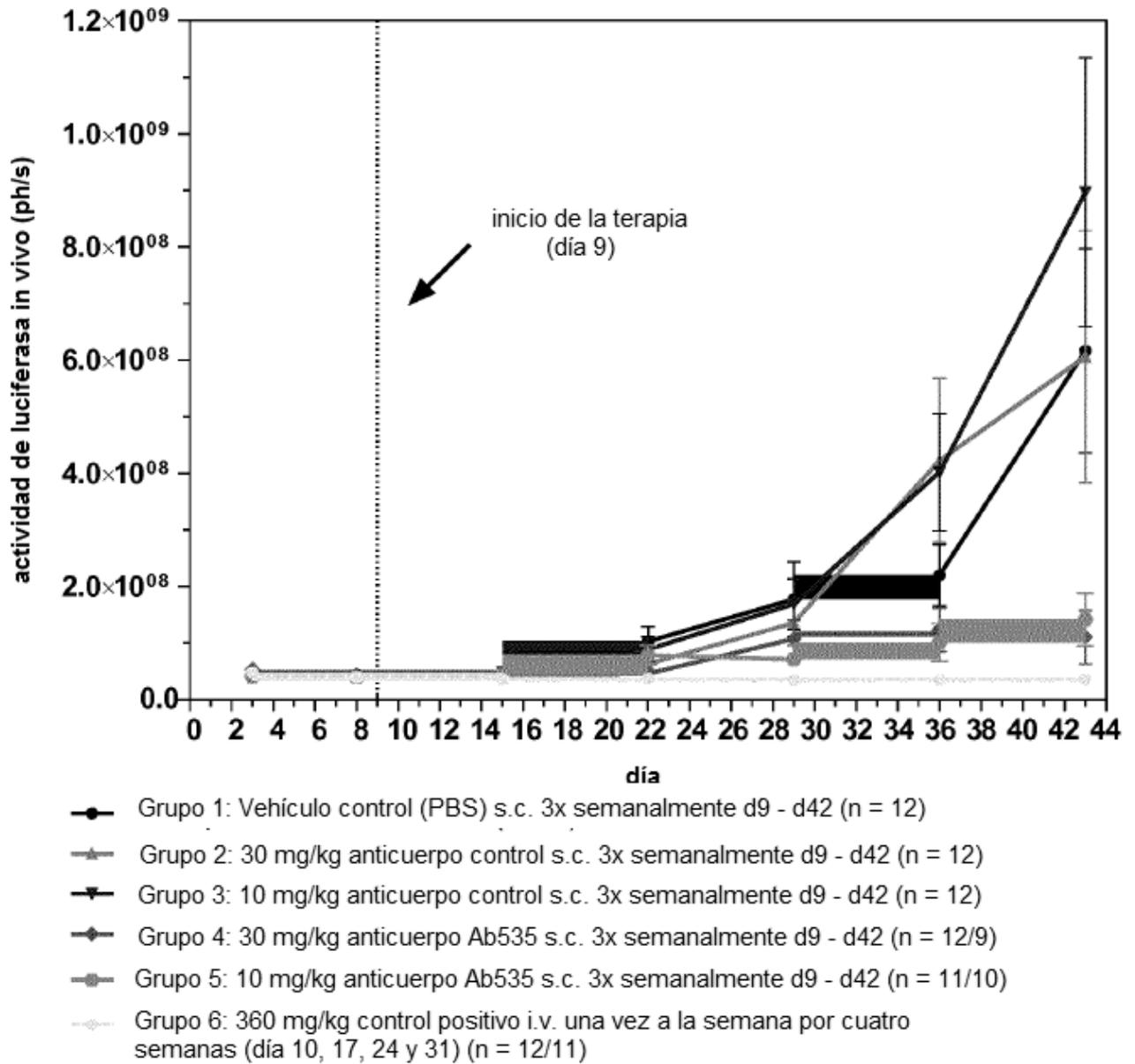


FIGURA 18a

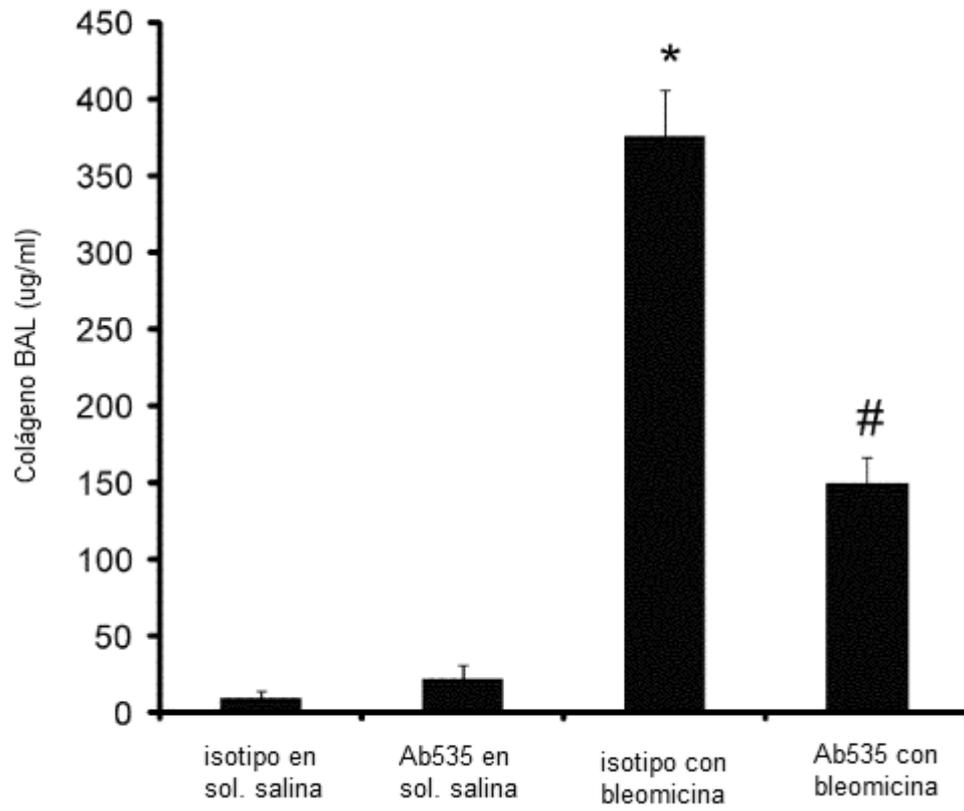


FIGURA 18b

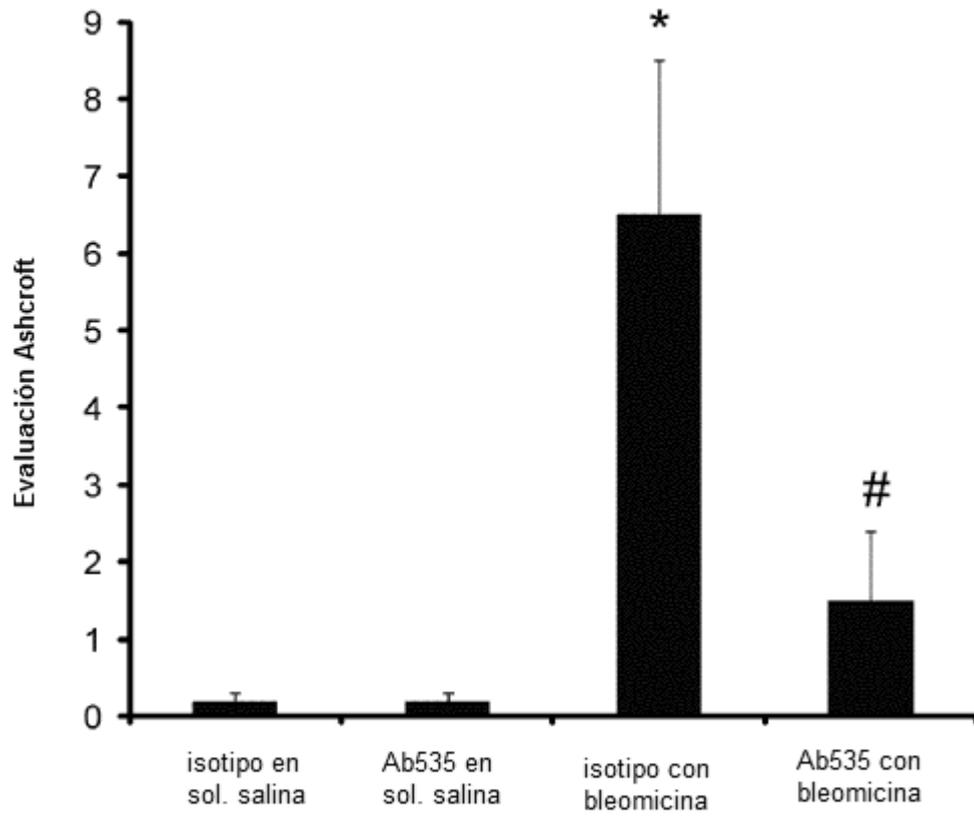


FIGURA 18c

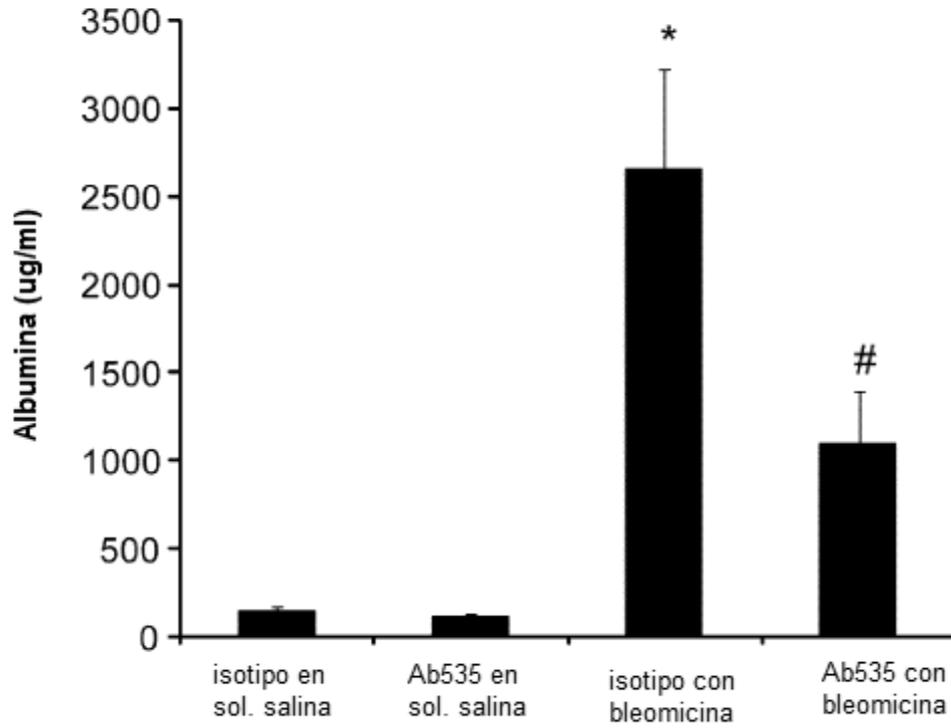


FIGURA 18d:

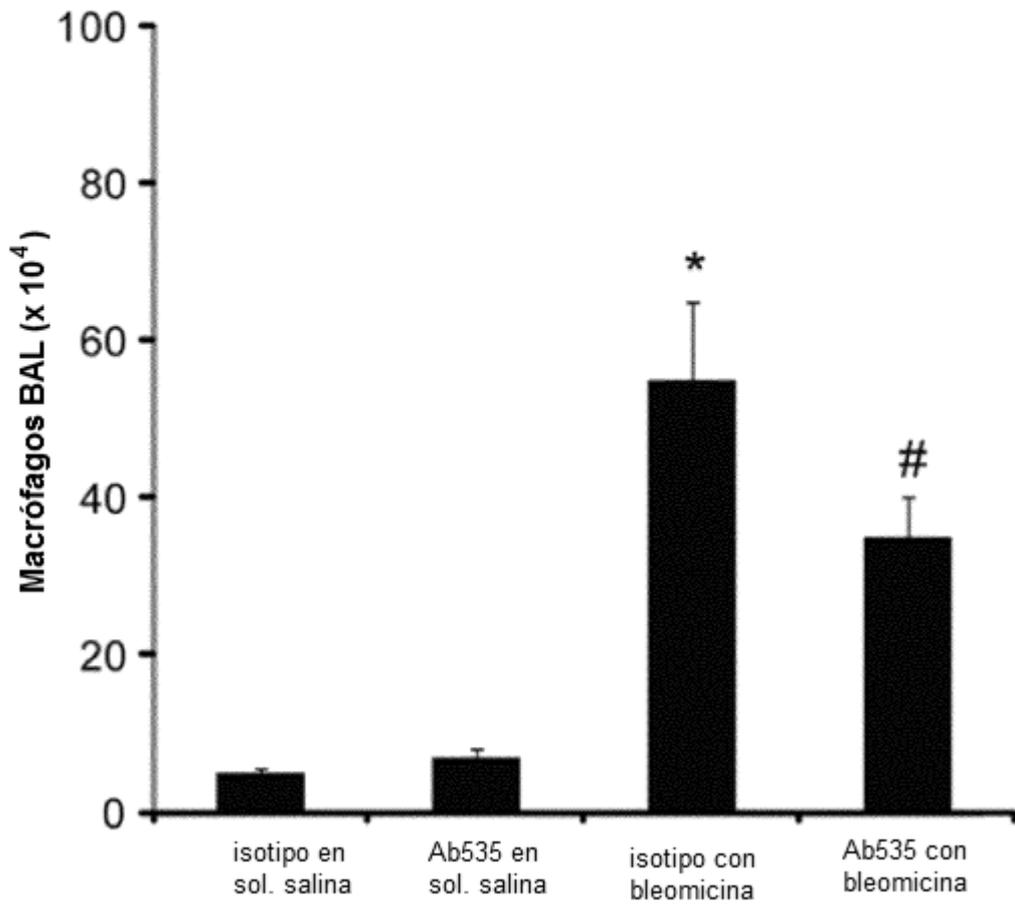


FIGURA 19

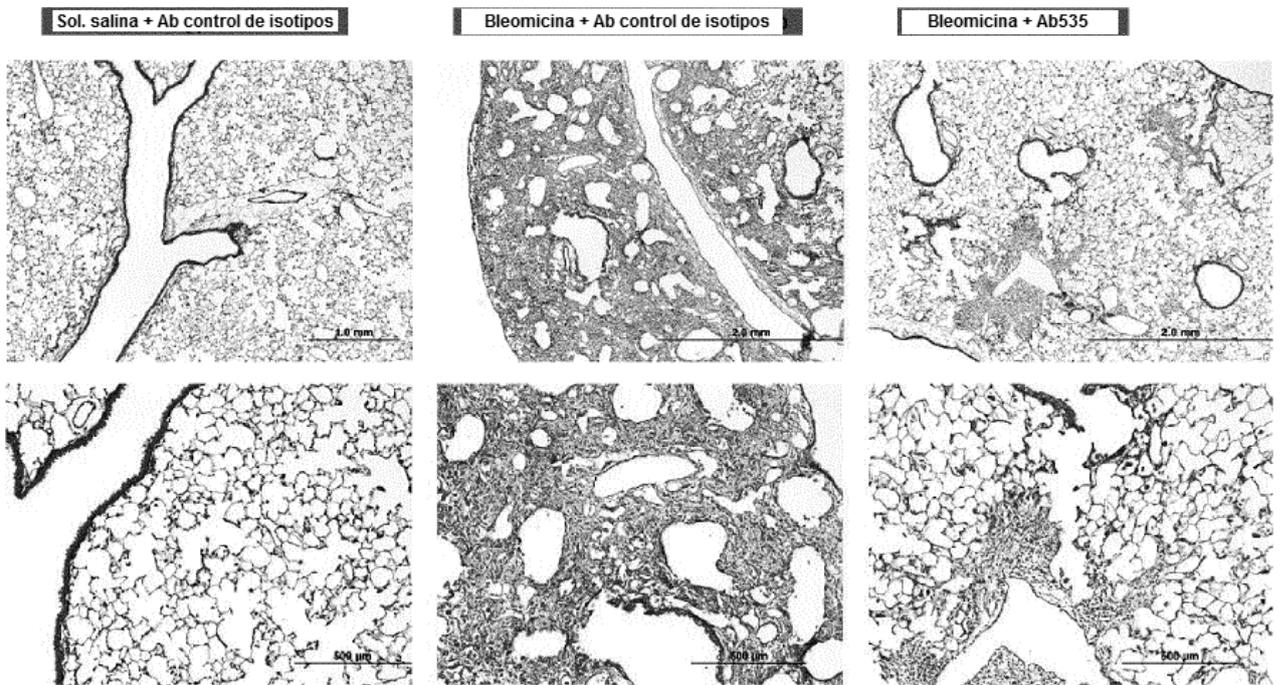


FIGURA 20a

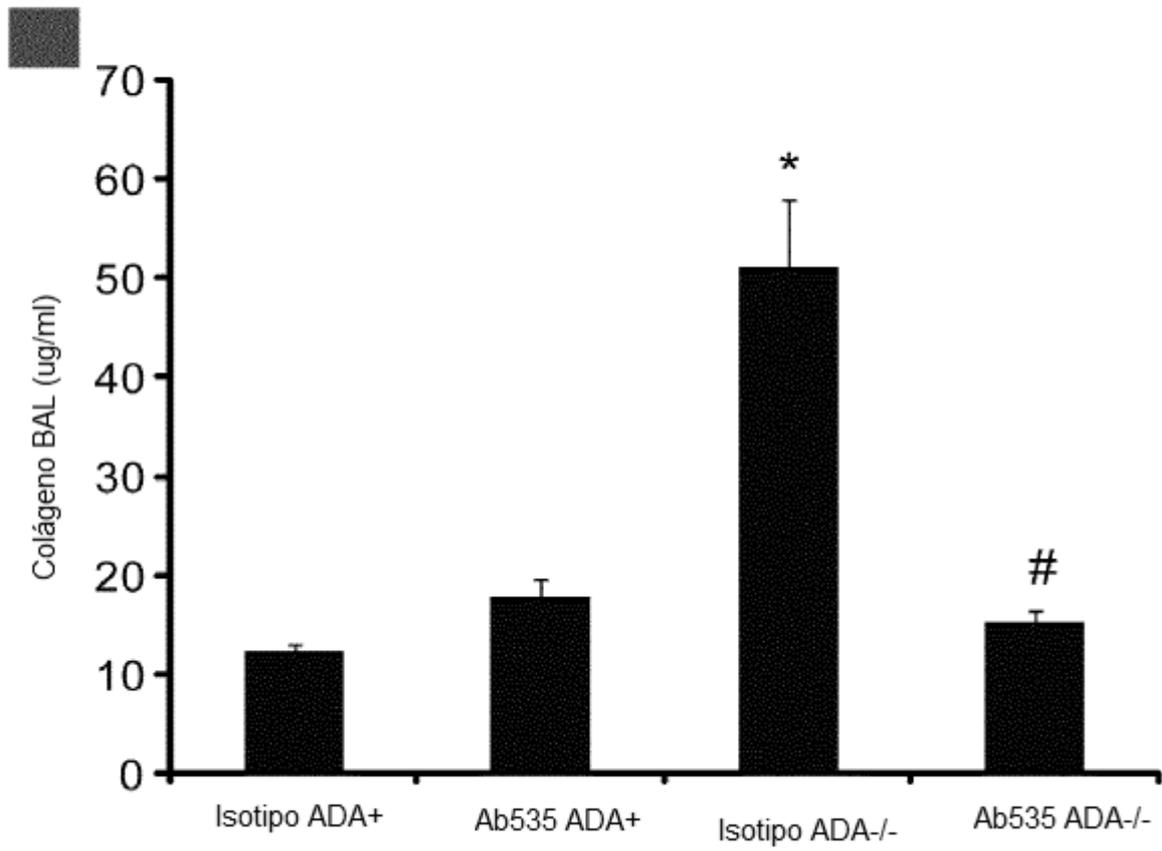


FIGURA 20b

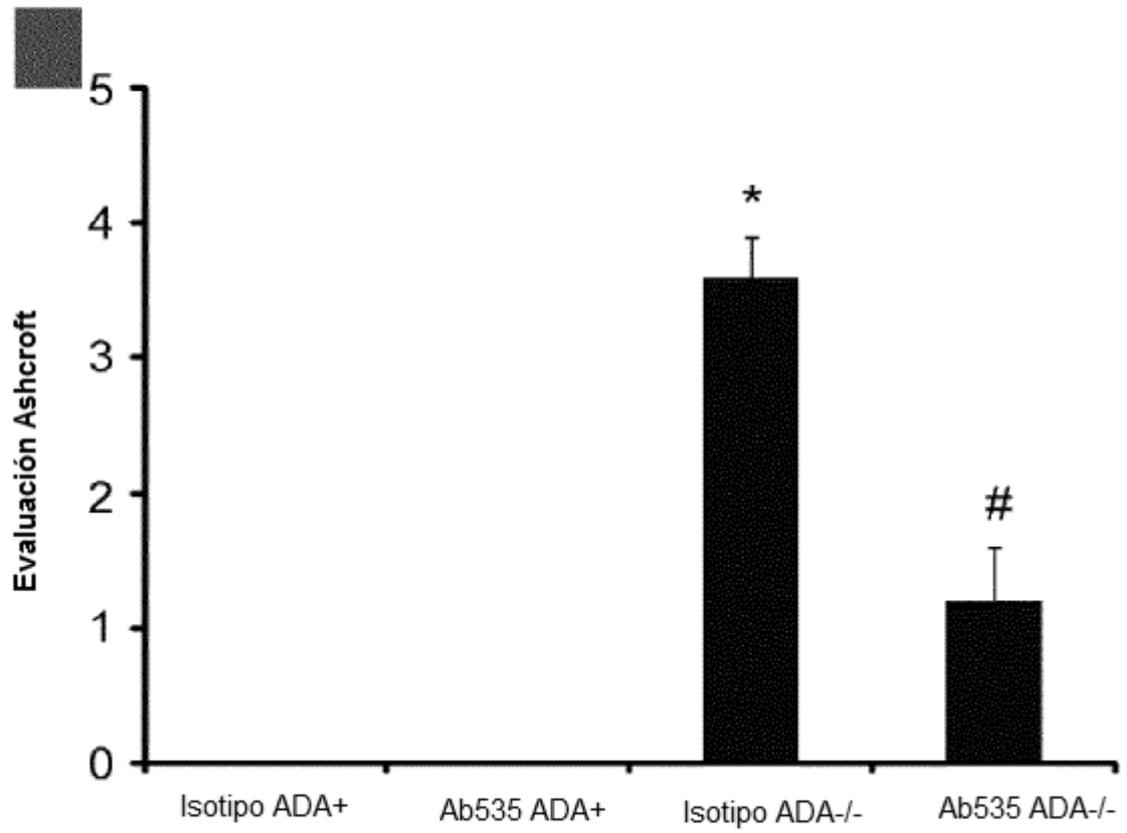


FIGURA 20c

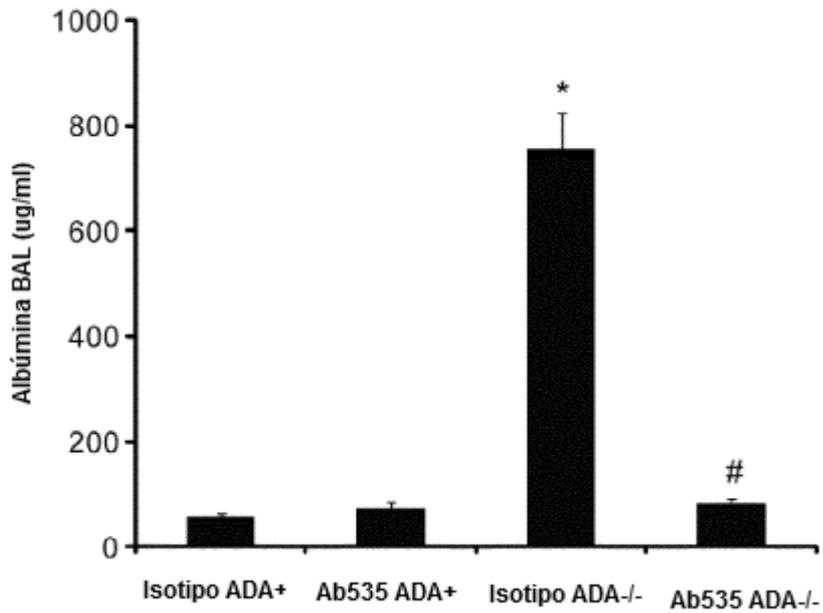
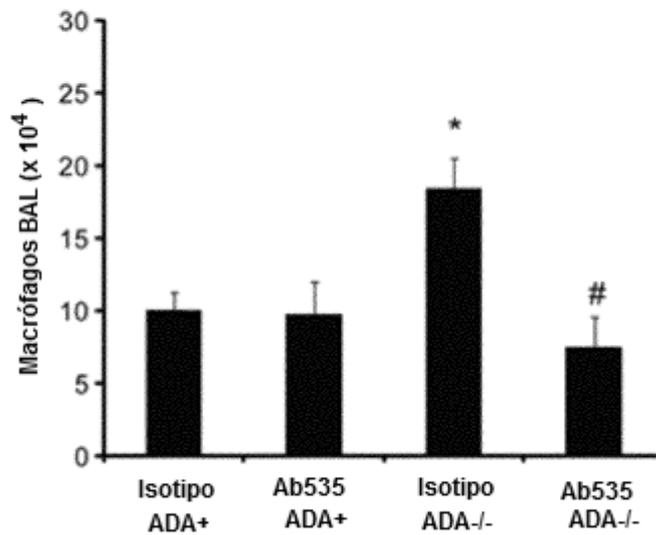


FIGURA 20d



* Denota la diferencia significativa de ratones ADA+ (tipo silvestre);
 # denota la diferencia significativa de ratones ADA-/- tratados con el anticuerpo control de isotipos ($p \leq 0.05$).

FIGURA 21

