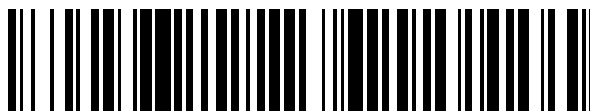


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 756**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2013 PCT/EP2013/054676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132044**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013 E 13708156 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2822588**

54 Título: **Politerapia de anticuerpos frente al CSF-1R humano y usos de los mismos**

30 Prioridad:

08.03.2012 EP 12158519

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

14.04.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CANNARILE, MICHAEL;
RIES, CAROLA;
RUETTINGER, DOMINIK y
WARTHA, KATHARINA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 753 756 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

Politerapia de anticuerpos frente al CSF-1R humano y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere, entre otros, a la combinación de anticuerpos frente al CSF-1R humano que se unen al CSF-1R humano, caracterizados por su unión a los dominios (de dimerización) D4 a D5 con un agente quimioterápico, radiación y/o inmunoterapia contra el cáncer.

Antecedentes de la invención

- 10 El receptor para CSF-1 humano (CSF-1R; receptor para el factor estimulante de colonias 1; sinónimos: receptor para M-CSF; receptor para el factor estimulante de colonias de macrófagos 1, protooncogén Fms, c-fms, SEQ ID NO: 62) se conoce desde 1986 (Coussens, L., *et al.*, Nature 320 (1986) 277-280). El CSF-1R es un factor de crecimiento y está codificado por el protooncogén c-fms (revisado, por ejemplo, en Roth, P. y Stanley, E.R., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181 (1992) 141-167).

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

- 25 Actualmente se conocen dos ligandos para CSF-1R que se unen al dominio extracelular de CSF-1R. El primero es el CSF-1 (factor estimulante de colonias 1, también llamado M-CSF, macrófago; SEQ ID NO: 86) y se encuentra extracelularmente como un homodímero enlazado por disulfuros (Stanley, E.R. *et al.*, Journal of Cellular Biochemistry 21 (1983) 151-159; Stanley, E.R. *et al.*, Stem Cells 12 Suppl. 1 (1995) 15-24). El segundo es IL-34 (IL-34 humana; SEQ ID NO: 87) (Hume, D. A., *et al.*, Blood 119 (2012) 1810-1820). Los principales efectos biológicos de la señalización de CSF-1R son la diferenciación, proliferación, migración y supervivencia de las células precursoras hematopoyéticas con respecto al linaje de macrófagos (incluyendo osteoclasto). La activación de CSF-1R está mediada por sus ligandos para CSF-1R, CSF-1 (M-CSF) e IL-34. La unión de CSF-1 (M-CSF) al CSF-1R induce la formación de homodímeros y la activación de la cinasa por fosforilación de la tirosina (Li, W. *et al.*, EMBO Journal. 10 (1991) 277-288; Stanley, E.R., *et al.*, Mol. Reprod. Dev. 46 (1997) 4-10).

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

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

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

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

artritis reumatoide por anticuerpos anti-CSF-1. Los documentos WO 2009/026303 y WO 2009/112245 se refieren a determinados anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al CSF-1R dentro de los primeros tres subdominios (D1 a D3) del dominio extracelular (CSF-1R-ECD) y a politerapias de estos anticuerpos. El documento WO2011/123381 (A1) se refiere a anticuerpos frente al CSF-1R y a politerapias de estos anticuerpos.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto expuesto en el presente documento que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones es solo para fines informativos. La invención comprende un anticuerpo que se une al CSF-1R humano para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el anticuerpo anti-CSF-1R se administra en combinación con un anticuerpo frente a CD40 agonista.

En un modo de realización, el anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza además por i) que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:39 y (b) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:40; o ii) que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 88 y (b) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 89. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo anti-CSF-1R se caracteriza por que el anticuerpo se une al dominio extracelular de CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64) (que comprende los dominios D1 a D5) y no se une a los dominios D1 a D3 (SEQ ID NO: 66) del dominio extracelular de CSF-1R humano.

Un modo de realización preferente de la invención es la politerapia de un anticuerpo que se une al CSF-1R humano (incluyendo anticuerpos que se unen a los dominios D1-D3 y anticuerpos que se unen a los dominios D4-D5, preferentemente anticuerpos que se unen a los dominios D4-D5 como se describe en el presente documento) con una inmunoterapia contra el cáncer, en la que la inmunoterapia contra el cáncer es un anticuerpo frente a CD40 agonista. Los anticuerpos frente al CSF-1R que se unen a los dominios D1-D3 de CSF-1R humano se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2009/026303 y WO 2009/112245 se refieren a determinados anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al CSF-1R dentro de los primeros tres subdominios (D1 a D3) del dominio extracelular (CSF-1R-ECD). El documento WO2011/123381(A1) se refiere a anticuerpos frente al CSF-1R y Sherr, C.J., *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793 (típicamente estos anticuerpos se caracterizan por inhibir la proliferación y/o señalización de CSF-1R dependiente de ligando para CSF-1R, pero no independiente de ligando para CSF-1R).

Los anticuerpos frente al CSF-1R que se unen a los dominios D4-D5 de CSF-1R humano se describen, por ejemplo, dentro de la presente invención, en el documento PCT/EP2012/075241 y Sherr, C.J., *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793 (típicamente estos anticuerpos se caracterizan por inhibir la proliferación y/o señalización de CSF-1R dependiente de ligando para CSF-1R e independiente de ligando para CSF-1R).

Por tanto, en un aspecto de la invención, también comprende un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el anticuerpo anti-CSF-1R se administra en combinación con inmunoterapia contra el cáncer, en el que la inmunoterapia contra el cáncer es un anticuerpo frente a CD40 agonista (como se describe, por ejemplo, por Beatty *et al.*, Science 331 (2011) 1612-1616, R. H. Vonderheide *et al.*, J Clin Oncol 25, 876 (2007); Khalil, M., *et al.*, Update Cancer Ther. 2007 June 1; 2(2): 61-65, los ejemplos en ensayos clínicos son, por ejemplo, CP-870.893 y dacetuzumab (un anticuerpo frente a CD40 agonista, número CAS 880486-59-9, SGN-40; anticuerpo S2C6 humanizado) (Khalil, M., *et al.*, Update Cancer Ther. 2007 June 1; 2(2): 61-65; un mAb anti-IgG2a de ratón de rata frente a CD40 agonista FGK45 como anticuerpo modelo se describe en S. P. Schoenberger, *et al.*, Nature 393, 480 (1998)). CP-870.893 es un anticuerpo agonista frente a CD40 de tipo IgG2 completamente humano desarrollado por Pfizer. Se une a CD40 con una KD de $3,48 \times 10^{-10}$ M, pero no bloquea la unión de CD40L (véanse, por ejemplo, los documentos U.S.7.338.660 o EP1476185, en los que CP-870.893 se describe como un anticuerpo 21.4.1). CP-870.893 (anticuerpo 21.4.1 de U.S.7.338.660) se caracteriza por comprender (a) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS GYTFTGYMHVWRQAPQGLEWM GWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTR DTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCA RDQPLGYCTNGVCSYFDYWGGQTL VTVSS (SEQ ID NO: 88) (que se corresponde con la SEQ ID NO: 42 del documento US 7.338.660) (b) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de DIQMTPSPSSVSASVGDRTITCRAS QGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDFATYYCQANIFPLTFGGGTKV EIK (SEQ ID NO: 89) (que se corresponde con la SEQ ID NO: 44 del documento US 7.338.660); y/o por tener las secuencias de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada y de dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo producido por el hibridoma 21.4.1 que tiene el número de acceso a la American Type Culture Collection (ATCC) PTA-3605. Dacetuzumab y otros anticuerpos S2C6 humanizados se describen en los documentos US6946129 y US8303955. Los anticuerpos S2C6 humanizados se basan, por ejemplo, en las CDR1, 2 y 3 del dominio variable de la cadena pesada y de la ligera del mAb murino S2C6 (depositado en la ATCC como PTA-110). Las CDR1, 2 y 3 del dominio variable de la cadena pesada y de la ligera del mAb murino S2C6 se describe y divulga en el documento US6946129. En un modo de realización, el anticuerpo frente a CD40 agonista es dacetuzumab. En un modo de realización, el anticuerpo frente a CD40 agonista se caracteriza por comprender (a) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS

GYSFTGYYIHVVRQAPGKGLEWVA RVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
GIYWWGQGTTLVTVS (SEQ ID NO: 90) (b) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRSSQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 91)).

5 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo anti-CSF-1R se caracteriza por que el anticuerpo se une al fragmento de CSF-1R humano delD4 (SEQ ID NO: 65) y al dominio extracelular de CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64) con una proporción de 1:50 o menor.

10 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo se caracteriza por que el anticuerpo no se une al fragmento de CSF-1R humano delD4 (SEQ ID NO: 65).

En un modo de realización de la invención, el anticuerpo se caracteriza por que

15 a) el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:7 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:8,

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

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

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

o una versión humanizada del mismo.

30 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo se caracteriza por que

a) el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:7 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:8,

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

o una versión humanizada del mismo.

40 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo se caracteriza por que

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

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

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

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

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

55 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo se caracteriza por que

60 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 1, una región CDR2 de SEQ ID NO: 2 y una región CDR1 de SEQ ID NO:3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 4, una región CDR2 de SEQ ID NO:5 y una región CDR1 de SEQ ID NO:6, o

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

65

c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21 y una región CDR1 de SEQ ID NO:22, o

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

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

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

20 g) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:52, una región CDR2 de SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 54; o

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

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

30 En un modo de realización de la invención, el anticuerpo es de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG4 humana.

35 Las politerapias de los anticuerpos descritos en el presente documento muestran beneficios para los pacientes que necesitan un tratamiento dirigido a CSF-1R. Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran actividad antiproliferativa eficaz frente a la proliferación independiente de ligando y dependiente de ligando y, por lo tanto, son especialmente útiles en el tratamiento del cáncer y metástasis en combinación con un anticuerpo agonista frente a CD40.

40 De forma sorprendente, se ha descubierto que, usando un fragmento de CSF-1R humano delD4 en el que se eliminó el subdominio D4 del CSF-1R-ECD humano (SEQ ID NO:65), se pudieron seleccionar los anticuerpos anti-CSF-1R. Estos anticuerpos muestran propiedades valiosas como excelente inhibición del crecimiento celular dependiente de ligando y, al mismo tiempo, inhibición del crecimiento celular independiente de ligando de células NIH3T3, infectadas de forma retroviral con un vector de expresión para CSF-1R natural de longitud completa (SEQ ID NO:62) o bien con L301S Y969F en CSF-1R mutante (SEQ ID NO:63), con lo que las células recombinantes de CSF-1R mutante pueden formar esferoides independientes del ligando CSF-1. Además, estos anticuerpos inhiben la diferenciación en macrófagos (tanto) humanos como de macaco cangrejero, ya que inhiben la supervivencia de los monocitos humanos y de macaco cangrejero.

50 Se pueden seleccionar otros anticuerpos que se unan a los dominios (de dimerización) D4 a D5 cribando anticuerpos que se unan al dominio extracelular completo de CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64) (incluyendo los dominios D1 a D5), y que no se unan a los dominios D1 a D3 (SEQ ID NO: 66) del dominio extracelular de CSF-1R humano.

Descripción de las figuras

Figura 1 Inhibición del crecimiento de células tumorales BeWo en cultivo en 3D con tratamiento con diferentes anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R a una concentración de 10 µg/ml.
Eje de abscisas: media de unidades relativas de luz (URL) normalizada por viabilidad correspondiente al contenido de ATP de las células (ensayo CellTiterGlo).
Eje de ordenadas: sondas sometidas a prueba: medio mínimo (FBS al 0,5 %), IgG1 de ratón (mlgG1, 10 µg/ml), IgG2a de ratón (mlgG2a 10 µg/ml), solo CSF-1, Mab 2F11, Mab 2E10, Mab2H7, Mab1G10 y SC 2-4A5. Se observó la inhibición más alta del crecimiento inducido por CSF-1 con los anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención.

Figura 2a Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de

base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): mientras que los anticuerpos Mab 3291 y sc 2-4A5 muestran claramente la unión a este fragmento delD4, los anticuerpos de acuerdo con la invención, por ejemplo, Mab 2F11 y Mab 2E10, no se unieron al fragmento de CSF-1R delD4. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento de CSF-1R delD4.

Figura 2b Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular del CSF-1R humano inmovilizado (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): todos los anticuerpos anti-CSF-1R muestran unión al CSF-1R-ECD. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 no se unió al CSF-1R-ECD.

Figura 2c Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-e7 humanizado no se unieron al fragmento de CSF-1R delD4. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento de CSF-1R delD4.

Figura 2d Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular del CSF-1R humano inmovilizado (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): todos los anticuerpos anti-CSF-1R Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-e7 humanizado mostraron unión al CSF-1R-ECD. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 no se unió al CSF-1R-ECD.

Figura 2e Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 del CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (SEQ ID NO: 65) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): todos los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 y MAB3291 muestran unión al fragmento de CSF-1R delD4. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento de CSF-1R delD4.

Figura 2f Sensograma de Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular del CSF-1R humano inmovilizado (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (eje de ordenadas: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje de abscisas: tiempo en segundos (s)): todos los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 y MAB3291 muestran unión al CSF-1R-ECD. El anticuerpo anti-CCR5 de control m<CCR5>Pz03.1C5 no se unió al CSF-1R-ECD.

Figura 3a-d Niveles de CSF-1 en macaco cangrejero después de la aplicación de diferentes dosificaciones de anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la invención.

Figura 4 Eficacia *in vivo*: inhibición del crecimiento tumoral de anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención en el xenoinjerto de cáncer de mama BT20.

Figura 5a-b **5a:** Monocitos humanos diferenciados en macrófagos con cocultivo de GM-CSF o CSF-1 (100 ng/ml de ligando). Después de 6 días de diferenciación, adición de RO7155. Se midió la viabilidad celular en el día 7 del tratamiento con anticuerpo en un ensayo de viabilidad CTG (CellTiterGlo®, Promega). Cálculo del % de viabilidad celular: Señales de URL de células tratadas divididas por la señal de URL del control no tratado sin anticuerpo, (n=4)
5b: Monocitos humanos diferenciados en macrófagos con GM-CSF (M1) o M-CSF (M2) durante 7 días. Fenotipo analizado por análisis por fluorescencia indirecta: tinción con anti-CD163 marcado con PE, anti-CD80 marcado con PE o anti-HLA-DR/DQ/DP marcado con Alexa647 mediante Zenon. El número en cada histograma se corresponde con la media de proporción de intensidad de fluorescencia (MRFI); proporción calculada entre la media de intensidad de fluorescencia (MFI) de células teñidas con el anticuerpo seleccionado (histograma en blanco) y el correspondiente control de isotipo (control negativo; histograma coloreado en gris) (media ± DE; n ≥ 5)

Figura 6a-c Eficacia *in vivo* de combinaciones de anticuerpos frente al <CSF1R de ratón> en el modelo *in vivo* de CRC de ratón MC38.

Figura 7 Eficacia *in vivo* de la combinación de anticuerpo frente al <CSF1R> y anticuerpo frente al <CD40>: la combinación de mAb frente al CSF1R + mAb frente a CD40 FGK45 muestra eficacia antitumoral mejorada sobre las monoterapias en el modelo de cáncer de colon de ratón MC38 singénico.

Descripción detallada de la invención

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

Muchos tumores se caracterizan por un infiltrado de células inmunitarias prominente, incluyendo los macrófagos. Inicialmente, se pensaba que las células inmunitarias eran parte de un mecanismo de defensa frente al tumor, pero los datos recientes respaldan la idea de que varias poblaciones de células inmunitarias, incluyendo macrófagos, pueden, de hecho, promover la progresión tumoral. Los macrófagos se caracterizan por su plasticidad. Dependiendo del microambiente de citocinas, los macrófagos pueden presentar los llamados subtipos M1 o M2. Los macrófagos M2 participan en la supresión de la inmunidad tumoral. También desempeñan un papel importante en las funciones de reparación tisular, tal como angiogénesis y remodelación tisular que el tumor coopta para favorecer el crecimiento. A diferencia de los macrófagos M2 promotores de tumores, los macrófagos M1 presentan actividad antitumoral por medio de la segregación de citocinas inflamatorias y su participación en la presentación antigénica y fagocitosis (Mantovani, A. *et al.*, Curr. Opin. Immunol. 2 (2010) 231-237).

Segregando diversas citocinas, tales como el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) e IL-10, las células tumorales pueden reclutar y conformar macrófagos en el subtipo M2, mientras que las citocinas, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), IFN-gamma, programan a los macrófagos hacia el subtipo M1. Usando inmunohistoquímica, es posible distinguir entre una subpoblación de macrófagos que coexpresa CD68 y CD163, que probablemente esté enriquecida en cuanto a macrófagos M2, y un subconjunto que muestra el inmunofenotipo CD68+/MHC II+ o CD68+/CD80+, que probablemente incluya macrófagos M1. La forma, el tamaño y la distribución espacial celulares de los macrófagos positivos para CD68 y CD163 es consecuente con las hipótesis publicadas sobre un papel promotor de tumores de los macrófagos M2, por ejemplo, por su localización preferencial en el estroma de intersección tumoral y las áreas tumorales vitales. Por el contrario, los macrófagos CD68+/MHC de clase II+ se encuentran de forma ubicua. Su papel hipotético en la fagocitosis se refleja en grupos de CD68+/MHC de clase II+, pero el inmunofenotipo CD163- cerca de células apoptóticas y áreas tumorales necróticas.

La expresión del subtipo y marcador de diferentes subpoblaciones de macrófagos está vinculada con su estado funcional. Los macrófagos M2 pueden favorecer la oncogénesis:

a) potenciando la angiogénesis por medio de la segregación de factores angiogénicos tales como VEGF o bFGF,

b) favoreciendo la formación de metástasis por medio de la segregación de metaloproteinasas de la matriz (MPM), factores de crecimiento y factores migratorios que guían las células tumorales a la circulación sanguínea y que establecen el nicho metastásico (Wyckoff, J. *et al.*, Cancer Res. 67 (2007) 2649-2656),

c) desempeñando un papel en la construcción de un medio inmunosupresor segregando citocinas inmunosupresoras, tales como IL-4, IL-13, IL-1ra y IL-10, que, a su vez, regulan la función de los linfocitos T reguladores. A la inversa, los linfocitos T positivos para CD4 han demostrado potenciar la actividad de los macrófagos promotores de tumores en modelos preclínicos (Mantovani, A. *et al.*, Eur. J. Cancer 40 (2004) 1660-1667; DeNardo, D. *et al.*, Cancer Cell 16 (2009) 91-102).

En consecuencia, en varios tipos de cáncer (por ejemplo, de mama, ovárico, linfoma de Hodgkin), se ha asociado la prevalencia de los macrófagos asociados a tumores (MAT) de subtipo M2 con un mal pronóstico (Bingle, L. *et al.*, J. Pathol. 3 (2002) 254-265; Orre, M., y Rogers, P.A., Gynecol. Oncol. 1 (1999) 47-50; Steidl, C. *et al.*, N. Engl. J. Med. 10 (2010) 875-885). Los datos recientes muestran una correlación del infiltrado de macrófagos positivos para CD163 en tumores y el grado tumoral (Kawamura, K. *et al.*, Pathol. Int. 59 (2009) 300-305). Los MAT aislados de tumores de pacientes tenían un fenotipo tolerante y no eran citotóxicos para las células tumorales (Mantovani, A. *et al.*, Eur. J. Cancer 40 (2004) 1660-1667). Sin embargo, la infiltración de MAT en presencia de linfocitos T citotóxicos se correlaciona con una supervivencia mejorada en el cáncer de pulmón no microcítico y de ahí que refleje un infiltrado de macrófagos M1 más prominente en este tipo tumoral (Kawai, O. *et al.*, Cancer 6 (2008) 1387-1395).

Recientemente, se demostró que una llamada firma inmunitaria que comprendía altos números de macrófagos y linfocitos T positivos para CD4, pero un bajo número de linfocitos T citotóxicos positivos para CD8, se correlacionaba con una supervivencia global (SG) reducida en pacientes con cáncer de mama y representaba un factor pronóstico independiente (DeNardo, D. *et al.*, Cancer Discovery 1 (2011) 54-67).

De forma consecuente con el papel para CSF-1 en el impulso de la función prooncogénica de los macrófagos M2, la alta expresión de CSF-1 en sarcomas infrecuentes o tumores en el tejido conjuntivo localmente invasores, tal como sinovitis vellonodular pigmentada (SVNP) y tumor tenosinovial de células gigantes (TTCG) que se debe, en parte, a una translocación del gen CSF-1, da lugar a la acumulación de monocitos y macrófagos que expresan el receptor para CSF-1, el receptor para el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1R), que forma la mayoría de la masa tumoral (West, R.B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3 (2006) 690-695). Estos tumores se usaron posteriormente para definir una firma de macrófagos dependiente de CSF-1 mediante un perfil de expresión génica. En los tumores de pacientes con cáncer de mama y liomiosarcoma, esta firma génica de respuesta a CSF-1 predice un mal pronóstico (Espinosa, I. *et al.*, Am. J. Pathol. 6 (2009) 2347-2356; Beck, A. *et al.*, Clin. Cancer Res. 3 (2009) 778-787).

El CSF-1R pertenece a la subfamilia de la clase III de receptores de tirosina cinasa y está codificado por el protoncógen c-fms. La unión de CSF-1 o IL-34 induce la dimerización del receptor, seguido de la autofosforilación y

activación de cascadas de señalización en dirección 3'. La activación de CSF-1R regula la supervivencia, proliferación y diferenciación de monocitos y macrófagos (Xiong, Y. *et al.*, J. Biol. Chem. 286 (2011) 952-960).

Además de las células del linaje monocítico y osteoclastos, que derivan del mismo precursor hematopoyético que el macrófago, también se ha descubierto que CSF-1R/c-fms se expresa por varios cánceres epiteliales humanos, tales como cáncer ovárico y de mama y en leiomiomasarcoma y TTCG/SVNP, aunque en menores niveles de expresión en comparación con los macrófagos. Como con TTCG/SVNP, los niveles elevados de CSF-1, el ligando para CSF-1R, en suero, así como la ascitis de pacientes con cáncer ovárico se han correlacionado con un mal pronóstico (Scholl, S. *et al.*, Br. J. Cancer 62 (1994) 342-346; Price, F. *et al.*, Am. J. Obstet. Gynecol. 168 (1993) 520-527). Además, una forma mutante constitutivamente activa de CSF 1R puede transformar células NIH3T3, una de las propiedades de un oncogén (Chambers, S., Future Oncol 5 (2009) 1429-1440).

Los modelos preclínicos proporcionan la validación de CSF-1R como diana oncológica. El bloqueo de CSF-1, así como la actividad de CSF-1R, da como resultado un reclutamiento reducido de MAT. La quimioterapia dio como resultado una expresión de CSF-1 elevada en células tumorales, dando lugar a un reclutamiento de MAT potenciado. El bloqueo de CSF-1R en combinación con paclitaxel dio como resultado la activación de linfocitos T citotóxicos positivos para CD8, dando lugar a un crecimiento tumoral y una carga metastásica reducidos en un modelo de cáncer de mama transgénico espontáneo (DeNardo, D. *et al.*, Cancer Discovery 1 (2011) 54-67).

Los anticuerpos anti-CSF-1R descritos en la invención se unen a los dominios extracelulares proximales a la membrana D4 y D5, que constituyen la interfase de dimerización del receptor. Bloquean la activación del receptor mediada por CSF-1, IL-34, así como independiente de ligando, lo que da como resultado la inducción de la apoptosis de macrófagos similares a M2 diferenciados *in vitro* en presencia de CSF-1, mientras se conservan los macrófagos diferenciados con GM-CSF similares a M1. En el tejido de cáncer de mama humano, los macrófagos M2 (CD68+/CD163+) y los macrófagos que expresan CSF 1R están colocalizados. En el macaco cangrejero, el tratamiento de 13 semanas con hMab 2F11-e7 redujo los macrófagos positivos para CD163 en el hígado y colon, pero no los macrófagos del pulmón.

A pesar de la introducción de varios agentes nuevos, el abordaje clínico de muchos tumores sólidos avanzados sigue siendo un desafío. Los avances en el entendimiento de la biología molecular del cáncer han estimulado la investigación sobre tratamientos más dirigidos con el objetivo de mejorar el resultado.

CSF-1R es una proteína codificada por el gen CSF-1R. Controla la producción, diferenciación y función de los macrófagos M2, que, a su vez, favorecen el crecimiento tumoral y la formación de metástasis y segregan citocinas inmunosupresoras, lo que da lugar a un mal pronóstico en los pacientes. Además, se ha demostrado que la presencia de macrófagos positivos para CSF-1R en varios cánceres humanos (tales como carcinoma ovárico y de mama) se correlaciona no solo con una densidad vascular incrementada, sino también con un peor resultado clínico. Los inhibidores de CSF-1R, que inhiben selectivamente los MAT similares a M2, han demostrado actividad en modelos preclínicos (DeNardo, D. *et al.*, Cancer Discovery 1 (2011) 54-67; Lin, E. *et al.*, J. Exp. Med. 193 (2001) 727-740). El bloqueo de la actividad de CSF-1R da como resultado un reclutamiento reducido de MAT y, en combinación con quimioterapia, una acción sinérgica da como resultado un crecimiento tumoral y una carga metastásica reducidos. Los datos recientes han demostrado que en pacientes con SVNP y TTCG, la sobreexpresión del CSF-1 se detecta y está mediada, en parte, por una translocación del gen CSF-1R (West, R.B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3 (2006) 690-695). En el cáncer de mama, la presencia de una firma génica de respuesta a CSF-1 predice el riesgo de recidiva y metástasis (Beck, A. *et al.*, Clin. Cancer Res. 3 (2009) 778-787).

La invención comprende la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que el anticuerpo se une al dominio extracelular de CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64) (que comprende los dominios D1 a D5) y no se une a los dominios D1 a D3 (SEQ ID NO: 66) del dominio extracelular de CSF-1R humano.

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

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por comprender como región CDR3 del dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47 o SEQ ID NO:55.

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

a) el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:7 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:8,

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

o una versión humanizada del mismo.

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

a) el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:7 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:8,

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

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

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

o una versión humanizada del mismo.

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

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

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

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

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

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

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

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

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

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

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

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

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

En un modo de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza por que

el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:23 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:24.

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:31 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:32.

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:39 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:40.

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

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

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

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

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

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

o una versión humanizada del mismo.

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

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

o una versión humanizada del mismo.

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:1, una región CDR2 de SEQ ID NO: 2, y una región CDR1 de SEQ ID NO:3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 4, una región CDR2 de SEQ ID NO:5, y una región CDR1 de SEQ ID NO:6, o,

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

c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21 y una región CDR1 de SEQ ID NO:22, o

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

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

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

g) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:52, una región CDR2 de SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 54.

La invención comprende además la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que

- 5 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:1, una región CDR2 de SEQ ID NO: 2, y una región CDR1 de SEQ ID NO:3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 4, una región CDR2 de SEQ ID NO:5, y una región CDR1 de SEQ ID NO:6, o
- 10 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 9, una región CDR2 de SEQ ID NO: 10, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 11, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:12, una región CDR2 de SEQ ID NO: 13, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 14, o
- 15 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21 y una región CDR1 de SEQ ID NO:22, o
- d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de SEQ ID NO: 26, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:28, una región CDR2 de SEQ ID NO: 29, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 30, o
- 20 e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de SEQ ID NO: 34, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:36, una región CDR2 de SEQ ID NO: 37, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 38, o
- 25 f) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:41, una región CDR2 de SEQ ID NO: 42, y una región CDR1 de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 44, una región CDR2 de SEQ ID NO:45, y una región CDR1 de SEQ ID NO:46, o
- 30 g) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:52, una región CDR2 de SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 54; o
- 35 h) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:69, una región CDR2 de SEQ ID NO: 70, y una región CDR1 de SEQ ID NO:71, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 72, una región CDR2 de SEQ ID NO:73, y una región CDR1 de SEQ ID NO:74, o
- i) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 77, una región CDR2 de SEQ ID NO: 78, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 79, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:80, una región CDR2 de SEQ ID NO: 81, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 82.
- 40 En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que
- a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:69, una región CDR2 de SEQ ID NO: 70, y una región CDR1 de SEQ ID NO:71, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 72, una región CDR2 de SEQ ID NO:73, y una región CDR1 de SEQ ID NO:74, o
- 45 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 77, una región CDR2 de SEQ ID NO: 78, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 79, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:80, una región CDR2 de SEQ ID NO: 81, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 82.
- 50 En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que
- a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21 y una región CDR1 de SEQ ID NO:22, o
- 55 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de SEQ ID NO: 26, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:28, una región CDR2 de SEQ ID NO: 29, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 30, o
- 60 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de SEQ ID NO: 34, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:36, una región CDR2 de SEQ ID NO: 37, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 38, o
- 65 d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:41, una región CDR2 de SEQ ID NO: 42, y una región CDR1 de SEQ ID NO:43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 44, una región CDR2 de SEQ ID NO:45, y una región CDR1 de SEQ ID NO:46, o

e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 52, una región CDR2 de SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 54.

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO: 21 y una región CDR1 de SEQ ID NO: 22, o

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

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

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

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO: 21, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 22.

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

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

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

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

En un modo de realización, la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano se caracteriza por que

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

En un modo de realización, el anticuerpo que se une al CSF-1R humano, caracterizado por que el anticuerpo se une al fragmento de CSF-1R humano de ID4 (SEQ ID NO: 65) y al CSF-1R-ECD humano (SEQ ID NO: 64) con una proporción de 1:50 o menor, se caracteriza además por que no se une al fragmento de CSF-1R humano D1-D3 (SEQ ID NO: 66).

El término "anticuerpo" engloba las diversas formas de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos con disminución de epítopos para linfocitos T y otros anticuerpos genomanipulados, siempre que se retengan las propiedades características de acuerdo con la invención. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferentemente el dominio variable del mismo, o al menos el sitio de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos scFv se han descrito por ejemplo, en Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-88). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio V_H de unión al CSF-1R, a saber, pudiéndose ensamblar conjuntamente con un dominio V_L , o de un dominio V_L de unión al CSF-1R, a saber, pudiéndose ensamblar conjuntamente con un dominio V_H en un sitio de unión a antígeno funcional y, de este modo, proporcionar la propiedad.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácido.

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

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que se han modificado las regiones estructurales o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un modo de realización preferente, se injerta una CDR murina en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véanse, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. Opcionalmente, se puede modificar la región estructural por otras mutaciones. También se pueden modificar las CDR por una o más mutaciones para generar anticuerpos de acuerdo con la invención, por ejemplo, por mutagénesis basada en el modelado molecular como se describe por Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033 u otros. Las CDR preferentes en particular se corresponden con las que representan secuencias que reconocen a los antígenos indicados anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Una "versión humanizada de un anticuerpo de acuerdo con la invención" (que es, por ejemplo, de origen murino) se refiere a un anticuerpo, que se basa en las secuencias de anticuerpo de ratón en las que los V_H y V_L se humanizan por técnicas estándar (incluyendo el injerto de CDR y, opcionalmente, la mutagénesis posterior de determinados aminoácidos en la región estructural y las CDR). Preferentemente, dicha versión humanizada está quimerizada con una región constante humana (véanse, por ejemplo, las secuencias SEQ ID NO:57-61).

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

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

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

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante" incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector

de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con las secuencias de VH y VL de estirpe germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de estirpe germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

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

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

El CSF-1R humano (receptor para CSF-1; sinónimos: receptor para M-CSF; receptor para el factor estimulante de colonias de macrófagos 1, protoncogén Fms, c-fms, SEQ ID NO: 62) se conoce desde 1986 (Coussens, L., *et al.*, Nature 320 (1986) 277-280). El CSF-1R es un factor de crecimiento y está codificado por el protoncogén c-fms (revisado, por ejemplo, en Roth, P. y Stanley, E.R., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181 (1992) 141-167).

CSF-1R es el receptor para los ligandos para CSF-1R CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos, también llamado M-CSF) (SEQ ID No.: 86) e IL-34 (SEQ ID No.: 87) y media en los efectos biológicos de estas citocinas (Sherr, C.J., *et al.*, Cell 41 (1985) 665-676; Lin, H., *et al.*, Science 320 (2008) 807-811). La clonación del receptor para el factor estimulante de colonias 1 (también llamado c-fms) se describió por primera vez en Roussel, M.F., *et al.*, Nature 325 (1987) 549-552. En esa publicación, se demostró que el CSF-1R tenía un potencial de transformación dependiente de los cambios en la cola C terminal de la proteína, incluyendo la pérdida de fosforilación de la tirosina 969 inhibidora que se une a Cbl y, de este modo, regula la regulación por disminución del receptor (Lee, P.S., *et al.*, Embo J. 18 (1999) 3616-3628).

El CSF-1R es un receptor de tirosina cinasa (RTC) transmembranario y monocatenario, y un miembro de la familia de RTC que contienen motivos de inmunoglobulina (Ig), caracterizado por 5 subdominios similares a Ig repetidos D1-D5 en el dominio extracelular (ECD) del receptor (Wang, Z., *et al* Molecular and Cellular Biology 13 (1993) 5348-5359). El dominio extracelular de CSF-1R (CSF-1R-ECD) humano (SEQ ID NO: 64) comprende los cinco subdominios extracelulares similares a Ig D1-D5. El fragmento de CSF-1R humano del D4 (SEQ ID NO: 65) comprende los subdominios extracelulares similares a D1-D3 y D5, pero carece del subdominio D4. El fragmento de CSF-1R humano D1-D3 (SEQ ID NO: 66) comprende los subdominios D1-D3 respectivos. Las secuencias se enumeran sin el péptido señal MGSGPGVLLL LLVATAWHGQ G (SEQ ID NO: 67). El fragmento de CSF-1R humano D4-D3 (SEQ ID NO: 85) comprende los subdominios D4-D3 respectivos.

Actualmente se conocen dos ligandos para CSF-1R que se unen al dominio extracelular de CSF-1R. El primero es CSF-1 (factor estimulante de colonias 1, también llamado M-CSF, macrófago; CSF-1 humano, SEQ ID NO: 86) y se encuentra extracelularmente como un homodímero enlazado por disulfuros (Stanley, E.R. *et al.*, Journal of Cellular Biochemistry 21 (1983) 151-159; Stanley, E.R. *et al.*, Stem Cells 12 Suppl. 1 (1995) 15-24). El segundo es IL-34 (IL-34 humana; SEQ ID NO: 87) (Hume, D. A., *et al.*, Blood 119 (2012) 1810-1820). Por tanto, en un modo de realización, la expresión "ligando para CSF-1R" se refiere a CSF-1 humano (SEQ ID NO: 86) y/o IL-34 humano (SEQ ID NO: 87).

Para los experimentos, a menudo se usa el fragmento activo de 149 aminoácidos (aa) del CSF-1 humano (aa 33-181 de SEQ ID NO: 86). Este fragmento activo de 149 aa del CSF-1 humano (aa 33-181 de SEQ ID NO: 86) está contenido en las 3 formas principales de CSF-1 y es suficiente para mediar en la unión al CSF-1R (Hume, D. A., *et al*, Blood 119 (2012) 1810-1820).

Los principales efectos biológicos de la señalización de CSF-1R son la diferenciación, proliferación, migración y supervivencia de las células precursoras hematopoyéticas con respecto al linaje de macrófagos (incluyendo osteoclástico). La activación de CSF-1R está mediada por sus ligandos para CSF-1R, CSF-1 (M-CSF) e IL-34. La

unión de CSF-1 (M-CSF) al CSF-1R induce la formación de homodímeros y la activación de la cinasa por fosforilación de la tirosina (Li, W. *et al*, EMBO Journal.10 (1991) 277-288; Stanley, E.R., *et al.*, Mol. Reprod. Dev. 46 (1997) 4-10).

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

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

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

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

Esto significa que dichos anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención no se unen al fragmento de CSF-1R humano delD4 (como el anticuerpo anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18-8-2004 en DSMZ) y tienen señales de unión para la unión al fragmento de CSF-1R humano delD4 en el intervalo del anticuerpo anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 que están por debajo de 20 UR (unidades de respuesta), preferentemente por debajo de 10 UR en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) como se muestra en el ejemplo 4.

La expresión "unión al fragmento de CSF-1R humano D1-D3" se refiere a una determinación de la afinidad de unión por un ensayo de resonancia de plasmón superficial (ensayo en Biacore). El anticuerpo de prueba se captura en la superficie y se añadió el fragmento de CSF-1R humano D1-D3 (SEQ ID NO: 66) y se determinaron las afinidades de unión respectivas. Las expresiones "no se une al fragmento de CSF-1R humano D1-D3" o "que no se unen al fragmento de CSF-1R humano D1-D3" indican que en dicho ensayo la señal detectada estaba en el área de no más de 1,2 veces la señal de fondo y, por lo tanto, no se pudo detectar ninguna unión significativa y no se pudo determinar ninguna afinidad de unión (véase el ejemplo 10).

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

a) medir la unión de los anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular de CSF-1R (CSF-1R-ECD) humano (SEQ ID NO: 64) por un ensayo de resonancia de plasmón superficial (ensayo en Biacore),

b) medir la unión de los anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento de CSF-1R humano D1-D3 (SEQ ID NO: 66) (D1-D3),

c) seleccionar los anticuerpos que se unen específicamente al dominio extracelular de CSF-1R (CSF-1R-ECD) humano y que no se unen al fragmento de CSF-1R humano D1-D3 (SEQ ID NO: 66) (D1-D3).

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

a) determinar la señal de unión (unidades de respuesta (UR)) de los anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento de CSF-1R humano delD4 (SEQ ID NO: 65) y al dominio extracelular de CSF-1R (CSF-1R-ECD) humano (SEQ ID NO: 64) por un ensayo de resonancia de plasmón superficial (ensayo en Biacore),

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

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

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

El término "epítipo" indica un determinante proteico del CSF-1R humano que se puede unir específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten normalmente en agrupaciones de moléculas químicamente activas en superficie, tales como aminoácidos o cadenas laterales glucídicas, y normalmente los epítipos tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención se une específicamente a un CSF-1R natural y a uno desnaturalizado.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la diferenciación en macrófagos (tanto) humanos como de macaco cangrejero (que se indica por la inhibición de la supervivencia de los monocitos humanos y de macaco cangrejero como se muestra en los ejemplos 7 y 8). En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la supervivencia de los monocitos humanos con una CI_{50} de 0,15 μ g/ml o menor, en un modo de realización, con una CI_{50} de 0,10 μ g/ml o menor. La inhibición de la supervivencia de los monocitos humanos se determina como se muestra en el ejemplo 7. En un modo de realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la supervivencia de los monocitos de macaco cangrejero en un 80 % o más, en un modo de realización en un 90 % o más (a una concentración de anticuerpo de 5 μ g/ml; y en comparación con la ausencia de anticuerpo). La inhibición de la supervivencia de los monocitos humanos se determina como se muestra en el ejemplo 8.

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

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

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

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

La expresión en células NS0 se describe, por ejemplo, por Barnes, L.M., *et al.*, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M., *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R.,

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

5 Las secuencias de control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

10 El ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está enlazado de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia

15 codificante si se sitúa para facilitar la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de un líder segregador, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. El enlace se consigue por fijación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

20 Los anticuerpos monoclonales se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-seferosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales. Las células de

25 hibridoma pueden servir como fuente de dichos ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN se puede insertar en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

30 Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable y todas dichas designaciones incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma, sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la

35 descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula transformada originalmente.

La "parte Fc" de un anticuerpo no está implicada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presenta diversas funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es una expresión bien conocida por el

40 experto en la técnica y se define en base a la escisión con papaína de los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, IgA1 e IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de la cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo

45 está directamente implicada en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) en base a la activación del complemento, la unión a C1q y la unión al receptor Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpos IgG. Mientras que la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento es dependiente de determinadas condiciones, la unión a C1q está provocada por sitios de unión

50 definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, por Boackle, R.J., *et al.*, Nature 282 (1979) 742-743; Lukas, T.J., *et al.*, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., *et al.*, Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., *et al.*, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., *et al.*, J. Virology 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324; el

55 documento EP 0 307 434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat, E.A., véase a continuación). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran activación del complemento y unión a C1q y C3, mientras que la IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une ni a C1q ni a C3.

60 En un modo de realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una parte Fc derivada de origen humano y preferentemente todas las demás partes de las regiones constantes humanas. Como se usa en el presente documento, la expresión "parte Fc derivada de origen humano" indica una parte Fc que es una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferentemente una parte Fc de la subclase IgG1 humana, una parte Fc mutada de la subclase IgG1 humana (preferentemente con una mutación en L234A + L235A),

65 una parte Fc de la subclase IgG4 humana o bien una parte Fc mutada de la subclase IgG4 humana (preferentemente con una mutación en S228P). Las más preferentes son las regiones constantes de la cadena

pesada humanas de SEQ ID NO: 58 (subclase IgG1 humana), SEQ ID NO: 59 (subclase IgG1 humana con mutaciones en L234A y L235A), SEQ ID NO: 60 de la subclase IgG4 humana o SEQ ID NO: 61 (subclase IgG4 humana con mutación en S228P).

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

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

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

20 a) el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:7 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:8,

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

25 o una versión humanizada del mismo.

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

30 a) el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:7 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:8,

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

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

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

o una versión humanizada del mismo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:23 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:24.

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

25 el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:31 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:32.

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

30 el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:39 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:40.

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

35 el dominio variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO:47 y el dominio variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO:48.

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

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

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

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

o una versión humanizada del mismo.

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

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

o una versión humanizada del mismo.

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

65

a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:1, una región CDR2 de SEQ ID NO: 2, y una región CDR1 de SEQ ID NO:3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 4, una región CDR2 de SEQ ID NO:5, y una región CDR1 de SEQ ID NO:6, o,

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

10 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21 y una región CDR1 de SEQ ID NO:22, o

15 d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de SEQ ID NO: 26, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:28, una región CDR2 de SEQ ID NO: 29, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 30, o

20 e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de SEQ ID NO: 34, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:36, una región CDR2 de SEQ ID NO: 37, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 38, o

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

25 g) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:52, una región CDR2 de SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 54; o

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

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

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

40 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21 y una región CDR1 de SEQ ID NO:22, o

45 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 25, una región CDR2 de SEQ ID NO: 26, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:28, una región CDR2 de SEQ ID NO: 29, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 30, o

50 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de SEQ ID NO: 34, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:36, una región CDR2 de SEQ ID NO: 37, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 38, o

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

e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 49, una región CDR2 de SEQ ID NO: 50, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:52, una región CDR2 de SEQ ID NO: 53, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 54.

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

65 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18 y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21 y una región CDR1 de SEQ ID NO:22, o

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

5 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 33, una región CDR2 de SEQ ID NO: 34, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO:36, una región CDR2 de SEQ ID NO: 37, y una región CDR1 de SEQ ID NO: 38, o

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

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

15 el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 17, una región CDR2 de SEQ ID NO: 18, y una región CDR1 de SEQ ID NO:19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de SEQ ID NO: 20, una región CDR2 de SEQ ID NO:21, y una región CDR1 de SEQ ID NO:22.

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

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

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

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

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

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

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

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

60 La sinovitis vellonodular pigmentada (SVNP) y los tumores tenosinoviales de células gigantes (TTCG) se pueden producir como resultado de una translocación que fusiona el gen M-CSF con un gen de colágeno COL6A3 y da como resultado la sobreexpresión de M-CSF (West, R.B., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 690-695). Se propone que un efecto panorámico sea responsable de la masa tumoral resultante que consiste en células monocíticas atraídas por células que expresan el M-CSF. Los TTCG son tumores más pequeños que se pueden

extraer con relativa facilidad de los dedos donde se producen principalmente. La SVNP es más invasora, ya que puede recidivar en grandes articulaciones y no se controla tan fácilmente de forma quirúrgica.

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

El tercer mecanismo se basa en la observación reciente de que los macrófagos asociados a tumores (MAT) encontrados en tumores sólidos de cánceres de mama, de próstata, ovárico y de cuello uterino se correlacionaron con un mal pronóstico (Bingle, L., *et al.*, J. Pathol. 196 (2002) 254-265; Pollard, J.W., Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 71-78). Los macrófagos se reclutan en el tumor por el M-CSF y otras quimiocinas. A continuación, los macrófagos pueden contribuir a la progresión del tumor a través de la secreción de factores angiogénicos, proteasas y otros factores de crecimiento y citocinas, y pueden ser bloqueados por la inhibición de la señalización del CSF-1R. Recientemente, se demostró por Zins *et al.* (Zins, K., *et al.*, Cancer Res. 67 (2007) 1038-1045) que la expresión de ARNip del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), M-CSF o la combinación de ambos reduciría el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón entre un 34 % y un 50 % después de la inyección intratumoral del ARNip respectivo. El ARNip dirigido al TNF-alfa segregado por las células SW620 humanas redujo los niveles de M-CSF de ratón y dio lugar a la reducción de los macrófagos en el tumor. Además, el tratamiento de los xenoinjertos de tumores MCF7 con un fragmento de unión a antígeno dirigido frente al M-CSF dio como resultado un 40 % de inhibición del crecimiento tumoral, revirtió la resistencia a los quimioterápicos y mejoró la supervivencia de los ratones cuando se administró en combinación con quimioterápicos (Paulus, P., *et al.*, Cancer Res. 66 (2006) 4349-4356).

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

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

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

Rabello, D., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 347 (2006) 791-796 han demostrado que los SNP en el gen CSF1 presentaron una asociación positiva con la periodontitis aguda: una enfermedad inflamatoria de los tejidos periodontales que provoca pérdida de piezas dentales debida a la reabsorción del hueso alveolar.

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

La fisiopatología de la osteoporosis está mediada por la pérdida de osteoblastos formadores de hueso y reabsorción ósea incrementada dependiente de osteoclastos. Se han descrito datos complementarios por Cenci *et al.* que demuestran que una inyección de anticuerpo anti-M-CSF conserva la densidad ósea e inhibe la reabsorción ósea en ratones con ovariectomía (Cenci, S., *et al.*, J. Clin. Invest. 105 (2000) 1279-1287). Recientemente se identificó un vínculo potencial entre la disminución de la masa ósea posmenopáusica debida a la deficiencia de estrógenos y se descubrió que la presencia de linfocitos T que producen TNF-alfa afectaba el metabolismo óseo (Roggia, C., *et al.*, Minerva Med. 95 (2004) 125-132). Un posible mecanismo podría ser la inducción del M-CSF por el TNF-alfa *in vivo*. Se confirmó un papel importante del M-CSF en la osteoclastogénesis inducida por TNF-alfa por el efecto de un anticuerpo dirigido frente al M-CSF que bloqueaba la osteólisis inducida por TNF-alfa en ratones y, de este modo, generaba inhibidores de dianas potenciales de la señalización de CSF-1R para la artritis inflamatoria (Kitaura, H., *et al.*, J. Clin. Invest. 115 (2005) 3418-3427).

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

La disminución de la masa ósea inducida por el tratamiento del cáncer, especialmente en pacientes con cáncer de mama y próstata, es una indicación adicional donde un inhibidor de CSF-1R dirigido podría prevenir la disminución de la masa ósea (Lester, J.E., *et al.*, Br. J. Cancer 94 (2006) 30-35). Con un pronóstico mejorado para el cáncer de

mama incipiente, las consecuencias a largo plazo de los tratamientos posquirúrgicos se vuelven más importantes a medida que algunos de los tratamientos, incluyendo quimioterapia, radioterapia, inhibidores de la aromatasa y supresión ovárica, afectan al metabolismo óseo disminuyendo la densidad mineral ósea, dando como resultado un riesgo incrementado de osteoporosis y fracturas asociadas (Lester, J.E., *et al.*, Br. J. Cancer 94 (2006) 30-35). El

5 equivalente al tratamiento posquirúrgico con inhibidores de la aromatasa en el cáncer de mama es el tratamiento de supresión androgénica en el cáncer de próstata, que da lugar a la pérdida de la densidad mineral ósea e incrementa significativamente el riesgo de fracturas relacionadas con la osteoporosis (Stoch, S.A., *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 (2001) 2787-2791).

10 Es probable que la inhibición dirigida de la señalización de CSF-1R sea beneficiosa en otras indicaciones, así como cuando tipos de células dirigidas incluyen osteoclastos y macrófagos, por ejemplo, el tratamiento de complicaciones específicas en respuesta a la artroplastia como consecuencia de la artritis reumatoide. El fracaso de los implantes debido a la disminución de la masa ósea periprotésica y la consiguiente pérdida de las prótesis es una importante complicación de la artroplastia y requiere cirugía repetida con altas cargas socioeconómicas para el paciente

15 individual y el sistema sanitario. Hasta la fecha, no existe ningún tratamiento farmacológico aprobado para prevenir o inhibir la osteólisis periprotésica (Drees, P., *et al.*, Nat. Clin. Pract. Rheumatol. (2007) 165-171).

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

25 La artritis reumatoide, artritis psoriásica y artritis inflamatoria son por sí mismas indicaciones potenciales para los inhibidores de la señalización de CSF-1R, ya que consisten en un componente de macrófagos y en un grado variable de destrucción ósea (Ritchlin, C.T., *et al.*, J. Clin. Invest. 111 (2003) 821-831). La artrosis y la artritis reumatoide son enfermedades autoinmunitarias inflamatorias provocadas por la acumulación de macrófagos en el tejido conjuntivo e infiltración de macrófagos en el líquido sinovial, que está al menos parcialmente mediada por el M-CSF. Campbell, I., K., *et al.*, J. Leukoc. Biol. 68 (2000) 144-150, demostraron que el M-CSF se produce por

30 células de tejido articular humano (condrocitos, fibroblastos sinoviales) *in vitro* y se encuentra en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, lo que sugiere que contribuye a la proliferación del tejido sinovial y la infiltración de macrófagos que se asocia con la patogenia de la enfermedad. Es probable que la inhibición de la señalización de CSF-1R controle el número de macrófagos en la articulación y alivie el dolor de la destrucción ósea asociada. Para minimizar los efectos adversos y para entender adicionalmente el impacto de la señalización de CSF-1R en estas

35 indicaciones, un procedimiento es inhibir específicamente el CSF-1R sin dirigirse a una miríada de otras cinasas, tales como la cinasa Raf.

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

45 La expresión y señalización de M-CSF y CSF-1R se encuentra en microglía activada. La microglía, que son los macrófagos residentes del sistema nervioso central, se puede activar por diversas agresiones, incluyendo infección y lesiones traumáticas. El M-CSF se considera un regulador clave de las respuestas inflamatorias en el cerebro y los niveles de M-CSF se incrementan en el VIH-1, encefalitis, enfermedad de Alzheimer (EA) y tumores cerebrales. La microgliosis como consecuencia de la señalización autocrina por M-CSF/CSF-1R da como resultado la inducción de la liberación de citocinas inflamatorias y óxidos nítricos, como se demuestra, por ejemplo, usando un modelo de

50 daño neuronal experimental (Hao, A.J., *et al.*, Neuroscience 112 (2002) 889-900; Murphy, G.M., Jr., *et al.*, J. Biol. Chem. 273 (1998) 20967-20971). Se ha descubierto que la microglía que tiene una expresión incrementada de CSF-1R rodea a las placas en la EA y en el modelo de ratón transgénico de la EA V717F de proteína precursora de amiloides (Murphy, G.M., Jr., *et al.*, Am. J. Pathol. 157 (2000) 895-904). Por otra parte, los ratones op/op con menos microglía en el cerebro dieron como resultado el depósito fibrilar de beta-A y pérdida neuronal en comparación con el control normal, lo que sugiere que la microglía sí tiene una función neuroprotectora en el desarrollo de la EA que

55 falta en los ratones op/op (Kaku, M., *et al.*, Brain Res. Brain Res. Protoc. 12 (2003) 104-108).

La expresión y señalización del M-CSF y CSF-1R se asocia con la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (documento WO 2005/046657). El término "enfermedad inflamatoria intestinal" se refiere a trastornos crónicos graves del tubo digestivo caracterizados por una inflamación crónica en diversos sitios en el tubo gastrointestinal, e incluye específicamente la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn.

La invención comprende la politerapia con un anticuerpo que se une al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión a epítopo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de

65 aminoácidos y fragmentos de secuencia de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento del cáncer.

La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado por comprender el anticuerpo que se une al CSF-1R humano que se caracteriza por las propiedades de unión a epítipo mencionadas anteriormente o, de forma alternativa, por las secuencias de aminoácidos y fragmentos de secuencia de aminoácidos mencionados anteriormente para el tratamiento de combinación del cáncer como se describe en el presente documento o de forma alternativa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de combinación del cáncer como se describe en el presente documento.

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

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

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

La expresión en células NS0 se describe, por ejemplo, por Barnes, L.M., *et al.*, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK 293) se describe por Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83, y por Schlaeger, E.-J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-CSF-1R se preparan por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan al aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis con casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-CSF-1R humanizado.

Los dominios variables de la cadena pesada y de la ligera de acuerdo con la invención se combinan con secuencias de promotor, iniciación de la traducción, región constante, región no traducida en 3', poliadenilación y terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de la cadena pesada y de la ligera se pueden combinar en un único vector, cotransfectar, transfectar en serie o transfectar por separado en células huésped que, a continuación, se fusionan para formar una única célula huésped que exprese ambas cadenas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o la porción de unión a antígeno del mismo, de la presente invención, formulada conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción/reabsorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para su inyección o infusión.

Una composición de la presente invención se puede administrar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para

sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Además de agua, el vehículo puede ser, por ejemplo, una solución salina tamponada isotónica.

5 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

10 Se pueden variar los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente (cantidad eficaz). El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del
15 compuesto particular que se emplea, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general y antecedentes médicos anteriores del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

20 La expresión "un procedimiento de tratamiento", o su equivalente, cuando se aplica, por ejemplo, al cáncer, se refiere a un procedimiento o modo de acción que está diseñado para reducir o eliminar el número de células cancerosas en un paciente o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un procedimiento de tratamiento" del cáncer u otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que las células cancerosas u otro trastorno se eliminarán realmente, que el número de células o trastorno se reducirán realmente o que los síntomas de un cáncer u otro trastorno se aliviarán realmente. A menudo, un procedimiento de tratamiento del cáncer se realizará incluso con una
25 baja probabilidad de éxito, pero, dados los antecedentes médicos y la expectativa de supervivencia estimada de un paciente, se considera, no obstante, que induce un modo de acción beneficioso global.

Las expresiones "administrado en combinación con" o "coadministración", "coadministrar" se refieren a la administración del anticuerpo anti-CSF-1R y el agente quimioterápico, radioterapia y/o inmunoterapia contra el
30 cáncer, por ejemplo, como formulaciones/aplicaciones separadas (o como una única formulación/aplicación). La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, en la que preferentemente existe un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Dicho anticuerpo y dicho otro agente se coadministran simultánea o bien secuencialmente (por ejemplo, intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua. Cuando ambos agentes terapéuticos se coadministran
35 secuencialmente, la dosis se administra el mismo día en dos administraciones separadas o bien uno de los agentes se administra el día 1 y el segundo se coadministra del día 2 al día 7, preferentemente del día 2 al 4. Por tanto, en un modo de realización, el término "secuencialmente" significa dentro de los 7 días después de la dosis del primer componente, preferentemente dentro de los 4 días después de la dosis del primer componente; y el término "simultáneamente" significa al mismo tiempo. El término "coadministración" con respecto a las dosis de
40 mantenimiento del anticuerpo anti-CSF-1R significa que las dosis de mantenimiento se pueden coadministrar simultáneamente, si el ciclo de tratamiento es apropiado para ambos fármacos, por ejemplo, cada semana. O el otro agente se administra, por ejemplo, cada primer a tercer día y dicho anticuerpo se administra cada semana. O las dosis de mantenimiento se coadministran secuencialmente, en uno o bien en varios días.

45 Es evidente que los anticuerpos se administran al paciente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o simplemente "cantidad eficaz") que es la cantidad del respectivo compuesto o combinación que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que se busca por el investigador, veterinario, médico u otro facultativo.

50 La cantidad de coadministración y el momento de la coadministración dependerán del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y afección del paciente que se está tratando y de la gravedad de la enfermedad o afección que se está tratando. Dicho anticuerpo anti-CSF-1R y otro agente se administran adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos, por ejemplo, el mismo día o al día siguiente.

55 Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de dicho anticuerpo anti-CSF-1R; es una dosificación candidata inicial para la coadministración de ambos fármacos al paciente. La invención comprende el uso de los anticuerpos de acuerdo con la invención para el tratamiento de un paciente que padece cáncer, especialmente cáncer de colon, pulmón o páncreas.

60 La invención también comprende un procedimiento para el tratamiento de un paciente que padece dicha enfermedad.

La invención proporciona además un procedimiento para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y el uso del anticuerpo de acuerdo con la invención para dicho procedimiento.
65

La invención proporciona además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para la fabricación de un agente farmacéutico, preferentemente conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que padece cáncer.

5 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para la fabricación de un agente farmacéutico, preferentemente conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que padece cáncer.

10 Se proporcionan los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras para ayudar a entender la presente invención, exponiéndose su verdadero alcance en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las secuencias

15	SEQ ID NO: 1	CDR3 de la cadena pesada, Mab 2F11
	SEQ ID NO: 2	CDR2 de la cadena pesada, Mab 2F11
	SEQ ID NO: 3	CDR1 de la cadena pesada, Mab 2F11
20	SEQ ID NO: 4	CDR3 de la cadena ligera, Mab 2F11
	SEQ ID NO: 5	CDR2 de la cadena ligera, Mab 2F11
	SEQ ID NO: 6	CDR1 de la cadena ligera, Mab 2F11
25	SEQ ID NO: 7	dominio variable de la cadena pesada, Mab 2F11
	SEQ ID NO: 8	dominio variable de la cadena ligera, Mab 2F11
30	SEQ ID NO: 9	CDR3 de la cadena pesada, Mab 2E10
	SEQ ID NO: 10	CDR2 de la cadena pesada, Mab 2E10
	SEQ ID NO: 11	CDR1 de la cadena pesada, Mab 2E10
35	SEQ ID NO: 12	CDR3 de la cadena ligera, Mab 2E10
	SEQ ID NO: 13	CDR2 de la cadena ligera, Mab 2E10
40	SEQ ID NO: 14	CDR1 de la cadena ligera, Mab 2E10
	SEQ ID NO: 15	dominio variable de la cadena pesada, Mab 2E10
	SEQ ID NO: 16	dominio variable de la cadena ligera, Mab 2E10
45	SEQ ID NO: 17	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11
	SEQ ID NO: 18	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11
50	SEQ ID NO: 19	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11
	SEQ ID NO: 20	CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11
	SEQ ID NO: 21	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11
55	SEQ ID NO: 22	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11
	SEQ ID NO: 23	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-c11
60	SEQ ID NO: 24	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-c11
	SEQ ID NO: 25	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8
	SEQ ID NO: 26	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8
65	SEQ ID NO: 27	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8

ES 2 753 756 T3

	SEQ ID NO: 28	CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
5	SEQ ID NO: 29	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
	SEQ ID NO: 30	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
	SEQ ID NO: 31	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-d8
10	SEQ ID NO: 32	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
	SEQ ID NO: 33	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
	SEQ ID NO: 34	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
15	SEQ ID NO: 35	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
	SEQ ID NO: 36	CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
20	SEQ ID NO: 37	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
	SEQ ID NO: 38	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
	SEQ ID NO: 39	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
25	SEQ ID NO: 40	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
	SEQ ID NO: 41	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
30	SEQ ID NO: 42	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
	SEQ ID NO: 43	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
	SEQ ID NO: 44	CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
35	SEQ ID NO: 45	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
	SEQ ID NO: 46	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
40	SEQ ID NO: 47	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
	SEQ ID NO: 48	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
	SEQ ID NO: 49	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
45	SEQ ID NO: 50	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
	SEQ ID NO: 51	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
50	SEQ ID NO: 52	CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
	SEQ ID NO: 53	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
	SEQ ID NO: 54	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
55	SEQ ID NO: 55	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
	SEQ ID NO: 56	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
60	SEQ ID NO: 57	región constante de la cadena ligera kappa humana
	SEQ ID NO: 58	región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG1
65	SEQ ID NO: 59	región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG1 mutada en L234A y L235A

ES 2 753 756 T3

	SEQ ID NO: 60	región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG4
	SEQ ID NO: 61	región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG4 mutada en S228P
5	SEQ ID NO: 62	CSF-1R natural humano (wt CSF-1R)
	SEQ ID NO: 63	L301S Y969F en CSF-1R mutante humano
10	SEQ ID NO: 64	dominio extracelular de CSF-1R humano (dominios D1-D5)
	SEQ ID NO: 65	fragmento de CSF-1R humano del D4
	SEQ ID NO: 66	dominios D1-D3 del fragmento de CSF-1R humano
15	SEQ ID NO: 67	péptido señal
	SEQ ID NO: 68	Cebador
20	SEQ ID NO: 69	CDR3 de la cadena pesada, Mab 1G10
	SEQ ID NO: 70	CDR2 de la cadena pesada, Mab 1G10
	SEQ ID NO: 71	CDR1 de la cadena pesada, Mab 1G10
25	SEQ ID NO: 72	CDR3 de la cadena ligera, Mab 1G10
	SEQ ID NO: 73	CDR2 de la cadena ligera, Mab 1G10
30	SEQ ID NO: 74	CDR1 de la cadena ligera, Mab 1G10
	SEQ ID NO: 75	dominio variable de la cadena pesada, Mab 1G10
	SEQ ID NO: 76	dominio variable de la cadena ligera, Mab 1G10
35	SEQ ID NO: 77	CDR3 de la cadena pesada, Mab 2H7
	SEQ ID NO: 78	CDR2 de la cadena pesada, Mab 2H7
40	SEQ ID NO: 79	CDR1 de la cadena pesada, Mab 2H7
	SEQ ID NO: 80	CDR3 de la cadena ligera, Mab 2H7
	SEQ ID NO: 81	CDR2 de la cadena ligera, Mab 2H7
45	SEQ ID NO: 82	CDR1 de la cadena ligera, Mab 2H7
	SEQ ID NO: 83	dominio variable de la cadena pesada, Mab 2H7
50	SEQ ID NO: 84	dominio variable de la cadena ligera, Mab 2H7
	SEQ ID NO: 85	dominios D4-D5 del fragmento de CSF-1R humano
	SEQ ID NO: 86	CSF-1 humano
55	SEQ ID NO: 87	IL-34 humana
	SEQ ID NO: 88	dominio variable de la cadena pesada de CP-870.893 (anticuerpo 21.4.1 del documento U.S.7.338.660)
60	SEQ ID NO: 89	dominio variable de la cadena ligera de CP-870.893 (anticuerpo 21.4.1 del documento U.S.7.338.660)
	SEQ ID NO: 90	variante de dominio variable de la cadena pesada de S2C6 humanizado
65	SEQ ID NO: 91	variante de dominio variable de la cadena ligera de S2C6 humanizado

Ejemplos**Ejemplo 1****5 Generación de una línea de células de hibridoma que produce anticuerpos anti-CSF-1R****Procedimiento de inmunización de ratones NMRI**

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

15 ELISA específico para antígenos

Se determinaron los valores de anticuerpo anti-CSF-1R en sueros de ratones inmunizados por ELISA específico para antígenos.

20 Se capturaron 0,3 µg/ml de quimera de huCSF-1R-huFc (dominio extracelular soluble) en una placa con estreptavidina (MaxiSorb; MicroCoat, DE, n.º de cat. 11974998/MC1099) con 0,1 mg/ml de anticuerpo anti-Fcγ biotinilado (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat. 109-066-098) y se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón con F(ab')₂ conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Healthcare, Reino Unido, n.º de cat. NA9310V) diluido 1/800 en PBS/Tween 20 al 0,05 %/BSA al 0,5 %. Se diluyeron los sueros de todas las punciones 1/40 en
25 PBS/Tween 20 al 0,05 %/BSA al 0,5 % y se diluyeron en serie hasta 1/1638400. Se añadieron sueros diluidos a los pocillos. Se usó suero previo a las punciones como control negativo. Se usó una serie de diluciones de anticuerpo anti-CSF-1R humano de ratón Mab3291 (R&D Systems, Reino Unido) de 500 ng/ml a 0,25 ng/ml como control positivo. Todos los componentes se incubaron conjuntamente durante 1,5 horas, los pocillos se lavaron 6 veces con PBST (PBS/Tween 20 al 0,2 %) y los ensayos se desarrollaron con solución recién preparada de ABTS® (1 mg/ml) (ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) durante 10 minutos a TA. Se midió la absorbancia a
30 405 nm.

Generación de hibridomas

35 Los linfocitos de ratón se pueden aislar y fusionar con una línea de células de mieloma de ratón usando protocolos estándar basados en PEG para generar hibridomas. A continuación, los hibridomas resultantes se criban para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones de células individuales de linfocitos derivados de bazo de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón no segregadoras Ag8 P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL-1580) con PEG al 50 %. Las células se siembran en placas a
40 aproximadamente 10⁴ en una placa de microvaloración de 96 pocillos de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo. A continuación, se criban pocillos individuales por ELISA para determinar los anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-CSF-1R humanos. Una vez que se produce un crecimiento de hibridomas extenso, los hibridomas que segregan anticuerpos se vuelven a sembrar, se criban de nuevo y, si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R se pueden subclonar por FACS.
45 A continuación, se cultivan *in vitro* los subclones estables para producir anticuerpos en el medio de cultivo tisular para su caracterización. Se podrían seleccionar anticuerpos de acuerdo con la invención usando la determinación de la unión de anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento de CSF-1R humano delD4 y al dominio extracelular de CSF-1R (CSF-1R-ECD) humano como se describe en el ejemplo 4, así como la determinación de la inhibición del crecimiento de células NIH3T3 transfectadas con CSF-1R natural (señalización dependiente de ligando) o L301S Y969F en CSF-1R mutante (señalización independiente de ligando) con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R como se describe en el ejemplo 5.

Cultivo de hibridomas

55 Se cultivaron hibridomas de muMAb generados en RPMI 1640 (n.º de catálogo (n.º de cat.) PO4-17500 de PAN) complementado con L-glutamina 2 mM (n.º de cat. 35050-038 de GIBCO), piruvato de Na 1 mM (n.º de cat. 11360-039 de GIBCO), 1x NEAA (n.º de cat. 11140-035 de GIBCO), FCS al 10 % (n.º de cat. A15-649 de PAA), 1x Pen Strep (n.º de cat. 1074440 de Roche), 1x Nutridoma CS (n.º de cat. 1363743 de Roche), mercaptoetanol 50 µM (n.º de cat. 31350-010 de GIBCO) y 50 U/ml de IL-6 de ratón (n.º de cat. 1 444 581 de Roche) a 37 °C y un 5% de CO₂.
60 Algunos de los anticuerpos de ratón resultantes se han humanizado (por ejemplo, Mab 2F11) y se han expresado de forma recombinante.

Ejemplo 2**65 Inhibición de la unión de CSF-1 al CSF-1R (ELISA)**

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

En el comienzo, se recubrieron las placas con 0,5 mg/ml de anticuerpo anti-Fc γ biotinilado con F(ab')₂ de cabra (Jackson ImmunoResearch, n.º de cat 109-006-170) durante 1 hora (h).

Después de esto, los pocillos se bloquearon con PBS complementado con Tween®-20 al 0,2 % y BSA al 2 % (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 0,5 h. Se inmovilizaron 75 ng/ml de quimera de huCSF-1R-huFc (que forma el dominio extracelular soluble dimérico de huCSF-1R) en una placa durante 1 h. A continuación, se incubaron diluciones de anticuerpos purificados en PBS/Tween 20 al 0,05 %/BSA al 0,5 % durante 1 h. Después de añadir una mezcla de 3 ng/ml de hu CSF-1 (fragmento activo de 149 aa de CSF-1 humano (aa 33-181 de SEQ ID NO: 86); Biomol, DE, n.º de cat. 60530), se lavaron 6 veces 50 ng/ml de clon de anti-CSF-1 biotinilado BAF216 (R&D Systems, Reino Unido) y estreptavidina-HRP diluida 1:5000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, n.º de cat 11089153001) durante 1 h con PBST. Se usó anticuerpo anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.), que inhibe la interacción ligando-receptor, como control positivo. Las placas se desarrollaron con solución recién preparada de sustrato BM blue® POD (BM blue®: 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, Roche Diagnostics GmbH, DE, n.º de cat. 11484281001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 370 nm. Se encuentra una disminución de la absorbancia si el anticuerpo anti-CSF-1R provoca una liberación de CSF-1 del complejo dimérico. Todos los anticuerpos anti-CSF-1R mostraron una inhibición significativa de la interacción de CSF-1 con el CSF-1R (véase la tabla 1). Se usó anticuerpo anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU., véase también Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793), que inhibe la interacción ligando-receptor, como control de referencia.

Tabla 1:

Valores de CI₅₀ calculada para la inhibición de la interacción CSF-1/CSF-1R

Mab frente al CSF-1R	CI ₅₀ de la inhibición de CSF-1/CSF-1R [ng/ml]
Mab 2F11	19,3
Mab 2E10	20,6
Mab 2H7	18,2
Mab 1G10	11,8
SC-2-4A5	35,2

Ejemplo 3

Inhibición de la fosforilación de CSF-1R inducida por CSF-1 en células recombinantes NIH3T3-CSF-1R

Se cultivaron 4,5x10³ células NIH3T3, infectadas de forma retroviral con un vector de expresión para CSF-1R de longitud completa, en DMEM (n.º de cat. E15-011 de PAA), L-glutamina 2 mM (Sigma, n.º de cat. G7513, piruvato de sodio 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales, FKS al 10 % (PAA, n.º de cat. A15-649) y 100 µg/ml de PenStrep (Sigma, n.º de cat. P4333 [10 mg/ml]) hasta que alcanzaron la confluencia. Después de esto, las células se lavaron con medios DMEM libres de suero (n.º de cat. 15-011 de PAA) complementados con selenito de sodio [5 ng/ml] (Sigma, n.º de cat. S9133), transferrina [10 µg/ml] (Sigma, n.º de cat. T8158), BSA [400 µg/ml] (Roche Diagnostics GmbH, n.º de cat. 10735078), L-glutamina 4 mM (Sigma, n.º de cat. G7513), piruvato de sodio 2 mM (Gibco, n.º de cat. 11360), 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, cat.: 11140-035), 2-mercaptoetanol [0,05 mM] (Merck, n.º de cat. M7522), 100 µg/ml y PenStrep (Sigma, n.º de cat. P4333) y se incubaron en 30 µl del mismo medio durante 16 horas para permitir la regulación por incremento del receptor. Se añadieron 10 µl de anticuerpos anti-CSF-1R diluidos a las células durante 1,5 h. A continuación, se estimularon las células con 10 µl de 100 ng/ml de hu CSF-1 (fragmento activo de 149 aa de CSF-1 humano (aa 33-181 de SEQ ID NO: 86); Biomol, DE, n.º de cat. 60530) durante 5 min. Después de la incubación, el sobrenadante se retiró, las células se lavaron dos veces con 80 µl de PBS enfriado en hielo y se añadieron 50 µl de tampón de lisis enfriado en hielo recién preparado (NaCl 150 mM/Tris 20 mM, pH 7,5/EDTA 1 mM/EGTA 1 mM/Tritón X-100 al 1 %/1 comprimido de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics GmbH, n.º de cat. 1 836 170) por 10 ml de tampón/10 µl/ml de mezcla de inhibidores de fosfatasa 1 (n.º de cat. P-2850 de Sigma, solución madre 100x)/10 µl/ml de inhibidor de proteasa 1 (n.º de cat. P-5726 de Sigma, solución madre 100x)/10 µl/ml de NaF 1 M). Después de 30 minutos en hielo, las placas se agitaron vigorosamente en un agitador de placas durante 3 minutos y, a continuación, se centrifugaron 10 minutos a 2200 rpm (Heraeus Megafuge 10).

La presencia del receptor para CSF-1 fosforilado y total en el lisado celular se analizó con Elisa. Para la detección del receptor fosforilado, se usó el kit de R&D Systems (n.º de cat. DYC3268-2) de acuerdo con las instrucciones del

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

Tabla 2:

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

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

Ejemplo 4

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

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

pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD (7836 pb) codifica el ECD completo del CSF-1R humano (SEQ ID NO: 64) fusionado en el extremo C con un sitio de escisión de proteasa PreScission, seguido de los aa 100-330 de IgG1 humana y una marca 6xHis, bajo el control del promotor de CMV. El péptido señal natural se ha variado por la inserción de los aminoácidos G y S después de la primera M, para crear un sitio de restricción de BamHI.

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

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

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

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

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

5

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

Instrumento: Biacore T100 (GE Healthcare)
 Programa Control T100, versión 2.0.1
 informático:
 T100 Evaluation, versión 2.0.2

Formato de Micromatriz: CM5
 ensayo

Temperatura: 25 °C

10 Los fragmentos de CSF-1R se inmovilizaron por medio de acoplamiento con aminas. Para comparar la unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención, se inyectó una concentración del anticuerpo de prueba. Se usaron Mab3291 (R&D-Systems) y SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU., véase también Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793) anti-CSF-1R como control de referencia, anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18-8-2004 en DSMZ) como control negativo, todos en las mismas condiciones
 15 que los anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención.

Acoplamiento con aminas de fragmentos de CSF-1R

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

25

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

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

30

Muestra de analito:

La unión se midió a un caudal de 30 µl/min por una inyección del analito con una concentración c = 10 nM. (para Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab 2F11-e7 humanizado en el segundo experimento). Cada inyección duró 700 segundos, seguido de una fase de disociación de 180 segundos. La regeneración final se realizó después de cada ciclo usando NaOH 50 mM, tiempo de contacto 60 segundos, caudal 30 µl/min.

35

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

40

Tabla 3a:

45

Unión de MAB frente al <CSF-1R> al fragmento de CSF-1R humano delD4 y CSF-1R-ECD y proporción a 25 °C, medida por RPS

	Unión a delD4 [UR]	Unión al CSF-1R- ECD [UR]	Proporción de unión de anticuerpos anti-CSF1R al fragmento de CSF1R delD4/al CSF-1R-ECD
Mab 3291	1015	627	1015/627 = 1,61
sc2-4A5	374	249	374/249 = 1,50
Mab 2F11	0	176	0/176 = 0
hMab 2F11-e7	0	237	0/237 = 0
Mab 2E10	0	120	0/120 = 0

	Unión a delD4 [UR]	Unión al CSF-1R- ECD [UR]	Proporción de unión de anticuerpos anti-CSF1R al fragmento de CSF1R delD4/al CSF-1R-ECD
Mab 1G10	0	2708	0/2708 = 0
Mab 2H7	0	147	0/147 = 0
m<CCR5>Pz03.1C5	2	5	-

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

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

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

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

En otro experimento se investigaron los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM (anticuerpo frente al CSF-1R que desplaza al ligando descrito en el documento WO2009026303), CXIIG6 (anticuerpo frente al CSF-1R que desplaza al ligando descrito en el documento WO 2009/112245), el anticuerpo anti-CSF-1R policlonal de cabra ab10676 (abcam). Se usó el anticuerpo anti-CSF-1R Mab3291 (R&D-Systems) como control de referencia. Se usó anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18-8-2004 en DSMZ) como control negativo.

Tabla 3b:

25 **Unión de MAB frente al <CSF-1R> al fragmento de CSF-1R humano delD4 y CSF-1R-ECD y proporción a 25 °C, medida por RPS**

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

30 1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 mostraron unión al CSF-1R-ECD y al delD4 (véase la fig. 2f y 2e).

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

Ejemplo 5

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

Se cultivaron células NIH3T3, infectadas de forma retroviral con un vector de expresión para CSF-1R natural de longitud completa (SEQ ID NO: 62) o bien con L301S Y969F en CSF-1R mutante (SEQ ID NO: 63) en medios DMEM con alto contenido de glucosa (PAA, Pasching, Austria) complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 2 mM y aminoácidos no esenciales y suero fetal bovino al 10 % (Sigma, Taufkirchen, Alemania) en placas recubiertas con poli-HEMA (poli(metacrilato de 2-hidroxietilo)) (Polysciences, Warrington, PA, EE. UU.) para prevenir su adherencia a la superficie de plástico. Se siembran las células en medio de reemplazo de suero con 5 ng/ml de selenito de sodio, 10 mg/ml de transferrina, 400 µg/ml de BSA y 2-mercaptoetanol 0,05 mM. Al tratarse con 100 ng/ml de hu CSF-1 (fragmento activo de 149 aa de CSF-1 humano (aa 33-181 de SEQ ID NO: 86); Biomol, DE, n.º de cat. 60530), las células que expresan el wtCSF-1R forman esferoides densos que crecen tridimensionalmente, una propiedad que se llama independencia de anclaje. Estos esferoides se asemejan mucho a la arquitectura tridimensional y a la organización de tumores sólidos *in situ*. Las células recombinantes de CSF-1R mutante pueden formar esferoides independientes del ligando CSF-1. Los cultivos de esferoides se incubaron

durante 3 días en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo para determinar una CI_{50} (concentración con un 50 por ciento de inhibición de viabilidad celular). Se usó el ensayo CellTiterGlo para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células.

5 **Tabla 5a:**

Mab frente al CSF-1R	wtCSF-1R CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	CSF-1R mutante CI_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
Mab 2F11	1,1	8,0
Mab 2E10	0,49	4,9
Mab 2H7	0,31	5,3
Mab 1G10	0,29	14,2
SC 2-4A5	10,0	10,0

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

En otro experimento, se investigaron el anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la invención hMab 2F11-e7 y los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM (anticuerpo frente al CSF-1R que desplaza al ligando descrito en el documento WO 2009/026303), CXIIG6 (anticuerpo frente al CSF-1R que desplaza al ligando descrito en el documento WO 2009/112245), el anticuerpo anti-CSF-1R policlonal de cabra ab10676 (abcam) y SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU., véase también Sherr, C.J. *et al.*, Blood 73 (1989) 1786-1793).

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

Tabla 5b:

Mab frente al CSF-1R	wtCSF-1R CI_{30} [$\mu\text{g/ml}$]	CSF-1R mutante CI_{30} [$\mu\text{g/ml}$]
hMab 2F11-e7	4,91	0,54
1.2.SM	1,19	> 20 $\mu\text{g/ml}$ (-19 % de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$ =19 % de estimulación)
CXIIG6	> 20 $\mu\text{g/ml}$ (21 % de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$)	> 20 $\mu\text{g/ml}$ (-36% de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$ =36% de estimulación)
ab 10676	14,15	> 20 $\mu\text{g/ml}$ (0 % de inhibición a 20 $\mu\text{g/ml}$)
SC 2-4A5	16,62	2,56

Ejemplo 6

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

Se cultivaron células de coriocarcinoma BeWo (ATCC CCL-98) en medios F12K (Sigma, Steinheim, Alemania) complementados con FBS al 10 % (Sigma) y L-glutamina 2 mM. Se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas recubiertas con poli-HEMA (poli(metacrilato de 2-hidroxietilo)) de 96 pocillos que contenían medio F12K complementado con FBS al 0,5 % y BSA al 5 %. Simultáneamente, se añadieron 200 ng/ml de huCSF-1 (fragmento activo de 149 aa de CSF-1 humano (aa 33-181 de SEQ ID NO: 86)) y 10 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R y se incubó durante 6 días. El ensayo CellTiterGlo se usó para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células en unidades relativas de luz (URL). Cuando se trataron cultivos de esferoides de BeWo con diferentes anticuerpos anti-CSF-1R (10 $\mu\text{g/ml}$), se observó una inhibición del crecimiento inducido por CSF-1. Para calcular la inhibición mediada por anticuerpo, el valor de la media de URL de las células BeWo no estimuladas se sustrajo de todas las muestras. El valor de la media de URL de las células estimuladas con CSF-1 se estableció de forma arbitraria en un 100 %. Los valores de la media de URL de las células estimuladas con CSF-1 y tratadas con anticuerpos anti-CSF-1R se calcularon en % de URL estimuladas con CSF-1. La tabla 6 muestra los datos calculados de la inhibición del crecimiento de células tumorales BeWo en cultivo en 3D con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R; la fig. 1a y b representan valores de la media de URL normalizada.

Tabla 6:

Mab frente al CSF-1R	% de inhibición a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml
Solo CSF-1	0
Mab 2F11	70
Mab 2E10	102
Mab 2H7	103
Mab 1G10	99
SC 2-4A5	39

Ejemplo 7**Inhibición de la diferenciación en macrófagos humanos con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)**

Se aislaron monocitos humanos de sangre periférica usando RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail (n.º de cat. 15028 de StemCell Tech.). Se sembraron poblaciones de monocitos enriquecidas en placas de microvaloración de 96 pocillos ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo) en 100 µl de RPMI 1640 (n.º de cat. 31870 de Gibco) complementado con FCS al 10 % (n.º de cat. 11-090014M de GIBCO), L-glutamina 4 mM (n.º de cat. 25030 de GIBCO) y 1x PenStrep (n.º de cat. 1 074 440 de Roche) a 37 °C y un 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Cuando se añadieron 150 ng/ml de huCSF-1 al medio, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos adherentes. Esta diferenciación se pudo inhibir por adición de anticuerpos anti-CSF-1R. Además, la supervivencia de los monocitos está afectada y se pudo analizar por el análisis por CellTiterGlo (CTG). A partir de la inhibición dependiente de la concentración de la supervivencia de los monocitos por tratamiento con anticuerpo, se calculó la CI₅₀ (véase la tabla 7).

Tabla 7:

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

En una serie de pruebas separada, las versiones humanizadas de Mab 2 F11, por ejemplo, hMab 2F11-c11, hMab 2F11-d8, hMab 2F11-e7, hMab 2F11-f12, mostraron valores de CI₅₀ de 0,07 µg/ml (hMab 2F11-c11), 0,07 µg/ml (hMab 2F11-d8), 0,04 µg/ml (hMab 2F11-e7) y 0,09 µg/ml (hMab 2F11-f12).

Ejemplo 8**Inhibición de la diferenciación en macrófagos de macaco cangrejero con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)**

Se aislaron monocitos de macaco cangrejero de sangre periférica usando el kit para primates no humanos CD 14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-091-097) de acuerdo con la descripción del fabricante. Se sembraron poblaciones de monocitos enriquecidas en placas de microvaloración de 96 pocillos ($1-3 \times 10^4$ células/pocillo) en 100 µl de RPMI 1640 (n.º de cat. 31870 de Gibco) complementado con FCS al 10 % (n.º de cat. 11-090014M de GIBCO), L-glutamina 4 mM (n.º de cat. 25030 de GIBCO) y 1x PenStrep (n.º de cat. 1 074 440 de Roche) a 37 °C y un 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Cuando se añadieron 150 ng/ml de huCSF-1 al medio, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos adherentes. Esta diferenciación se pudo inhibir por adición de anticuerpos anti-CSF-1R. Además, la supervivencia de los monocitos está afectada y se pudo analizar por el análisis por CellTiterGlo (CTG). Se analizó la viabilidad a una concentración de 5 µg/ml de tratamiento con anticuerpo (véase la tabla 8).

Tabla 8:

Mab frente al CSF-1R	% de supervivencia	% de inhibición (de supervivencia)=(100 % - % de supervivencia)
Mab 2F11	4 *	96
Mab 2E10	17 **	83
Mab 2H7	8	92
Mab 1G10	2	98
SC 2-4A5	31	69

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

** media de dos experimentos usando solo el mAb murino

Ejemplo 9

10 Inhibición de la diferenciación en macrófagos M1 y M2 humanos con tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)

Se aislaron monocitos humanos de sangre periférica usando RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail (n.º de cat. 15028 de StemCell Tech.). Se sembraron poblaciones de monocitos enriquecidas en placas de microvaloración de 96 pocillos ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo) en 100 µl de RPMI 1640 (n.º de cat. 31870 de Gibco) complementado con FCS al 10 % (n.º de cat. 11-090014M de GIBCO), L-glutamina 4 mM (n.º de cat. 25030 de GIBCO) y 1x PenStrep (n.º de cat. 1 074 440 de Roche) a 37 °C y un 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Cuando se añadieron 100 ng/ml de huCSF-1 al medio durante 6 días, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos M2 adherentes con morfología alargada. Cuando se añadieron 100 ng/ml de huGM-CSF al medio durante 6 días, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos M1 adherentes con morfología redondeada. Esta diferenciación se asoció con la expresión de determinados marcadores, tales como CD163 para los macrófagos M2 y CD80, o alta para MHC de clase II para los macrófagos M1 como se evalúa por citometría de flujo. Las células se lavaron con PBS y, si eran adherentes, se separaron usando una solución de EDTA 5 mM en PBS (20 min a 37 °C). A continuación, las células se resuspendieron bien, se lavaron con tampón de tinción (FCS al 5 % en PBS) y se centrifugaron a 300xg durante 5 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de tampón de tinción y las células se contaron en una cámara Neubauer. Se transfirieron aproximadamente 1×10^5 células en cada tubo de FACS, se centrifugaron a 300xg durante 5 min y se resuspendieron en tampón de tinción. Los receptores Fcγ se bloquearon por incubación con 1 µg de IgG humana/ $2,5 \times 10^4$ células (n.º de cat. 009-000-003 de JIR) en tampón de tinción durante 20 min en hielo. A continuación, las células se mezclaron con 1,5 µl de anticuerpo/ $2,5 \times 10^4$ células para la detección de CD80 y CD163, mientras que se usaron 5 µl de anticuerpo/ $2,5 \times 10^4$ células para la detección de MHC de clase II: anticuerpo anti-CD163 humano de ratón marcado con PE (n.º de cat. 556018 de BD Bioscience), anticuerpo anti-CD80 humano de ratón marcado con PE (n.º de cat. 557227 de BD Bioscience) y anticuerpo anti MHC de clase II humano de ratón marcado con Alexa 647 (n.º de cat. de Dako M0775). El marcador Alexa 647 se conjugó con el anticuerpo usando el kit de marcaje de IgG de ratón con Alexa 647 mediante Zenon (n.º de cat. Z25008 de Invitrogen). Después de una incubación de 1 hora en hielo, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción, se resuspendieron y se midieron en un FACS Canto II.

La diferenciación exclusivamente en macrófagos M2, que se caracteriza por la expresión de CD163, ausencia de CD80 y baja expresión de MHC de clase II, se pudo inhibir por adición de anticuerpo anti-CSF-1R humanizado hMab 2F11-e7. Además, la supervivencia de los macrófagos M2, pero no M1, está afectada y se pudo analizar por análisis por CellTiterGlo (CTG). La inhibición dependiente de la concentración de la supervivencia de los macrófagos por tratamiento con anticuerpo durante 7 días se representa en la figura 5a. La expresión de los marcadores de macrófagos M1 y M2 evaluada por citometría de flujo se muestra en la figura 5b.

45 Ejemplo 10

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

Instrumento: BIACORE® A100

Micromatriz: CM5 (Biacore BR-1006-68)

Acoplamiento: acoplamiento con aminas

Tampón: PBS (Biacore BR-1006-72), pH 7,4, 35 °C

50 Para las mediciones de la afinidad, se han acoplado 36 µg/ml de anticuerpos anti-Fcγ de ratón (de cabra, Jackson Immuno Research, JIR115-005-071) a la superficie de la micromatriz para capturar los anticuerpos frente al CSF-1R. Se añadió el dominio extracelular de CSF-1R (CSF-1R-ECD) humano (que comprende los subdominios

extracelulares D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (329-MR de R&D-Systems o pCMV-presS-HisAvitag-hCSF-1R-ECD subclonado) en diversas concentraciones en solución. Se midió la asociación por una inyección de CSF-1R de 1,5 minutos a 35 °C; se midió la disociación lavando la superficie de la micromatriz con tampón durante 10 minutos a 35 °C. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Tabla 9:

Datos de afinidad medidos por RPS

Mab frente al CSF-1R	K _D (nM)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (min)
Mab 2F11	0,29	1,77E ⁺⁰⁵	5,18E ⁻⁰⁵	223
Mab 2E10	0,2	1,52E ⁺⁰⁵	2,97E ⁻⁰⁵	389
Mab 2H7	0,21	1,47E ⁺⁰⁵	3,12E ⁻⁰⁵	370
Mab 1G10	0,36	1,75E ⁺⁰⁵	6,28E ⁻⁰⁵	184

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

Ejemplo 11

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

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

Formato de ensayo Micromatriz: micromatriz CM5

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

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

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

Acoplamiento con aminas de moléculas de captura

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

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

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

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

muestra de analito:

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

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

Se calcularon los parámetros cinéticos usando la doble referencia normal (referencia de control: unión del analito a la molécula de captura; cubeta de lectura: concentración de CSF-1R con subdominios "0" como blanco) y cálculo con el modelo 'unión 1:1 de cinética de valoración con borrador'.

Tabla 10:

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

Mab frente al CSF-1R	Subdominio	K _D (nM)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	t _{1/2} (min)
Mab 2F11	D1-D3	sin unión			
Mab 2E10	D1-D3	sin unión			
Mab 2H7	D1-D3	no determinada			
Mab 1G10	D1-D3	sin unión			
SC-2-4A5	D1-D3	sin unión			
3291 de R&D-Systems	D1-D3	5,4	2,2E ⁺⁵	1,2E ⁻³	9,6

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

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

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

Ejemplo 12

Incremento del nivel de CSF-1 durante la inhibición de CSF-1R en macaco cangrejero

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

La administración de hMab 2F11-e7 indujo un incremento drástico de CSF-1 en ~ 1000 veces, que, dependiendo de la dosis administrada, duró 48 h (1 mg/kg) o 15 días (10 mg/kg). De ahí que un inhibidor de la dimerización para CSF-1R ofrezca la ventaja de no competir directamente con el ligando drásticamente regulado por incremento por la unión al receptor a diferencia de un anticuerpo que desplaza al ligando.

Ejemplo 13

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

La línea celular de cáncer de mama humano BT-20 expresa CSF-1R humano pero carece de expresión de CSF-1 (Sapi, E. *et al* Cancer Res 59 (1999) 5578-5585). Puesto que el CSF-1 derivado de ratón no puede activar el CSF-1R humano en las células tumorales, el CSF-1 humano recombinante (fragmento activo de 149 aa de CSF-1 humano (aa 33-181 de SEQ ID NO: 86) (Biomol, Hamburgo, Alemania) se complementó por medio de minibombas

osmóticas (ALZET, Cupertino, CA) que proporcionaban una tasa de infusión continua de CSF-1 de 2 µg/día (Martin, T.A., Carcinogenesis 24 (2003) 1317-1323).

Para comparar directamente la eficacia de un anticuerpo que interfiere en la dimerización del CSF-1R con un anticuerpo frente al CSF-1R que desplaza al ligando, se sometieron a prueba el Mab anti-CSF-1R quimérico 2F11 (anticuerpo que interfiere en la dimerización del CSF-1R) y 1.2.SM (anticuerpo frente al CSF-1R que desplaza al ligando descrito en el documento WO 2009/026303) en el modelo de xenoinjerto BT-20.

A ratones beis SCID (Charles River, Sulzfeld, Alemania) se les inyectaron conjuntamente por vía subcutánea 1x 10⁷ células BT-20 (ATCC HTB-19) y 100 µl de Matrigel. El tratamiento de los animales comenzó en el día de la aleatorización a una media del volumen tumoral de 100 mm³. Los ratones se tratan una vez por semana por vía i.p. con los anticuerpos respectivos (véase la figura 4) en tampón histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Las dimensiones tumorales se miden con un calibre comenzando el día de la estadificación y, posteriormente, 2 veces por semana durante el periodo de tratamiento al completo. El volumen del tumor se calcula de acuerdo con el protocolo del NCI (peso del tumor = 1/2ab², donde "a" y "b" son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente).

El análisis del crecimiento tumoral se muestra en la figura 4. La inhibición del CSF-1R humano en células tumorales con el Mab anti-CSF-1R 2F11 quimérico fue estadísticamente más eficaz en la mediación de la inhibición del crecimiento tumoral que el anticuerpo anti-CSF-1R 1.2.SM (anticuerpo frente al CSF-1R descrito en el documento WO 2009/026303).

En un experimento separado, se combinó el tratamiento con 3 mg/kg i.v. de docetaxel (Taxotere® Sanofi Aventis, Reino Unido) con el anticuerpo anti-CSF-1R de ratón (30 mg/kg i.p./por semana). Se administró docetaxel 3 veces por semana como 1 ciclo seguido de 3 semanas de descanso farmacológico. Después de 2 ciclos de tratamiento con docetaxel, la monoterapia con anticuerpo inhibió el crecimiento de tumores primarios (ICT: 83 %, PTCnp: 0,5, IC: 0,1-1,8) comparable con el grupo con 3 mg/kg de docetaxol (ICT: 75 %, PTCnp: 0,55, IC: 0,2-1,5). La combinación de docetaxol y el anticuerpo anti-CSF-1R dio como resultado una eficacia superior que con las monoterapias (ICT: 94 %, PTCnp: 0,3, IC: 0,1-0,8). En un punto de tiempo posterior, las diferencias en el ICT entre los grupos de combinación y monoterapia fueron menos pronunciadas debido a la fuerte inhibición de cada uno en la monoterapia. No obstante, el análisis de la mediana del tiempo de supervivencia reveló la superioridad de la combinación (anticuerpo 159d, docetaxel 154d, combinación 180d).

Ejemplo 14

Tratamiento de combinación de anticuerpos anti-CSF-1R que se unen a los dominios D4 a D5 del dominio extracelular de CSF-1R humano con paclitaxel.

2.1 Objetivos principales

Parte I (brazo A: aumento de la dosis de agente único [SA] de la versión humanizada de Mab anti-CSF-1R 2F11 (hMab 2F11-e7); brazo B: aumento de la dosis de anticuerpo frente al CSF-1R humanizado Mab 2F11 (hMab 2F11-e7) en combinación [CD] con dosis fija de paclitaxel):

- Evaluar la seguridad, tolerabilidad y FC de la versión humanizada de Mab 2F11 cuando se administra solo y en combinación con paclitaxel.

- Determinar la dosis máxima tolerada (DMT) y/o la dosis biológica óptima (DBO) de Mab 2F11 humanizado cuando se administra solo (DMT1/DBO1) y en combinación con paclitaxel (DMT2/DBO2) observando las toxicidades limitantes de la dosis (TLD).

Parte II (cohortes de expansión/solo agente único de Mab 2F11 humanizado): extender la evaluación de seguridad e investigar la actividad clínica de Mab 2F11 humanizado en pacientes con una entidad tumoral de particular interés en base a las observaciones en la parte I del estudio, todos los cuales no son susceptibles de tratamiento estándar.

2.2 Objetivos secundarios

Parte I (aumento de la dosis/brazo A+B)

- Explorar los efectos FC y FD del Mab 2F11 humanizado solo y en combinación con paclitaxel en el tejido tumoral y sustituto.

- Evaluar los efectos FD y de los biomarcadores de Mab 2F11 humanizado solo y en combinación con paclitaxel, como se mide por los cambios en la tomografía por emisión de positrones con 18F-fluorodesoxiglucosa (FDG-PET) y en la ecografía con contraste dinámico (DCE-US) (si estuviera disponible).

- Identificar la dosis de la fase 2 recomendada (RP2D) y las pautas para el anticuerpo frente al CSF-1R humanizado Mab 2F11 solo y en combinación con paclitaxel.

5 • Explorar la actividad clínica preliminar del Mab 2F11 humanizado solo y en combinación con paclitaxel, usando la tasa de respuesta objetiva (TRO), la tasa de beneficio clínico (TBC), la supervivencia sin progresión (SSP), la duración de la respuesta.

Parte II (cohortes de expansión/solo brazo A)

10 • Caracterizar además los efectos FC y FD del Mab 2F11 humanizado en el tejido tumoral y sustituto.

2.3 Objetivos de exploración

Las muestras de pacientes recogidas se analizarán para:

- 15 • identificar de forma retrospectiva tumores dependientes de MAT;
- explorar los posibles marcadores de pronóstico de la respuesta en el tejido sustituto, como la piel y la sangre;
- 20 • estudiar la asociación de los biomarcadores con la eficacia y/o acontecimientos adversos (AA) asociados con las especialidades farmacéuticas; y/o
- desarrollar biomarcadores o ensayos de diagnóstico;

3. DISEÑO DEL ESTUDIO

3.1 Visión general del diseño del estudio

30 Este es un estudio de aumento de la dosis sin enmascaramiento, multicéntrico, de fase Ia/b diseñado para evaluar la seguridad, tolerabilidad, FC y FD de la dosificación i.v. cada dos semanas (Q2W) de Mab 2F11 humanizado. Mab 2F11 humanizado se administrará solo a pacientes con tumores sólidos (que no sean susceptibles de tratamiento estándar y en combinación con paclitaxel en carcinoma localmente avanzado y/o metastásico que no sean susceptibles de tratamiento estándar.

Parte I: aumento de la dosis

35 Todos los pacientes incluidos en las cohortes de aumento de la dosis serán evaluados para determinar la TLD durante un periodo de evaluación de la TLD de 28 días después de la primera administración de Mab 2F11 humanizado en el ciclo 1. Se reemplazarán los pacientes que lo abandonen por cualquier motivo distinto a la TLD durante el periodo de evaluación la TLD.

40 Modo de administración de monoterapia con Mab 2F11 humanizado. El Mab 2F11 humanizado se administrará Q2W como infusión i.v. durante 1,5 h, a menos que el paciente experimente una reacción relacionada con la infusión (RRI) que requeriría una reducción o ralentización temporal de la infusión. El tratamiento se administrará hasta la progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable, muerte o rechazo por el paciente, lo que se produzca primero.

Modo de administración de combinación de Mab 2F11 humanizado y paclitaxel (parte I, solo brazo B).

50 El Mab 2F11 humanizado se administrará cada Q2W como infusión i.v. durante 1,5 h, a menos que el paciente experimente una RRI que requeriría una reducción o ralentización temporal de la infusión. El tratamiento se administrará hasta la progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable, muerte o rechazo por el paciente, lo que se produzca primero.

55 Paclitaxel, a una dosis de 80 mg/m², se administrará QW durante hasta 12 semanas en combinación con Mab 2F11 humanizado. La infusión de paclitaxel comenzará tan pronto como haya finalizado la infusión de Mab 2F11 humanizado y se administrará de acuerdo con la información de la ficha técnica. Si un paciente experimenta toxicidad directamente atribuible a paclitaxel, puede suspender el tratamiento con paclitaxel pero continuar recibiendo Mab 2F11 humanizado.

Parte I de la definición de ensayo de DMT1/DBO1 y DMT2/DBO2

Los primeros 28 días después de la primera administración de Mab 2F11 humanizado en el ciclo 1 se considerarán el intervalo de tratamiento para la determinación de la TLD para definir la DMT1 y DMT2.

65 La DMT se define como el/los nivel(es) de dosis más alto(s) en los que no más de 1 de cada 6 pacientes experimenta una TLD.

Los datos de seguridad y cualquier dato FC/FD disponible se recogerá de forma continua y se revisará antes de cada decisión de aumento de la dosis para la siguiente cohorte.

5 3.1.1-3.1.3 Fundamento del diseño del estudio

El cribado interno de muestras de biopsias de tumores de diferentes pacientes con diferentes neoplasias malignas ha demostrado una heterogeneidad significativa en la densidad de los macrófagos infiltrantes y la expresión de CSF-1R coincidente (consúltese la sección de farmacología no clínica del IB). La disposición de fármacos mediada por diana (TMDD), es decir, la distribución y eliminación por medio de la unión a la diana farmacológica, también fue claramente evidente en monos y en ratones tanto portadores de tumores como no portadores de tumores. Puesto que la farmacocinética del Mab 2F11 humanizado está afectada por su unión a la diana, se puede usar la cuantificación de la FC no lineal como un biomarcador para aproximar la saturación diana. Para caracterizar hasta qué punto los factores demográficos del paciente de referencia (incluyendo masa tumoral y densidad de MAT) pueden influir en la farmacocinética no lineal del Mab 2F11 humanizado, los niveles en sangre se medirán dentro de los primeros días después de una única 'dosis de preinclusión' baja (100 mg) (ciclo 0) en todos los pacientes de la cohorte 2 en adelante (es decir, 1 semana antes de su dosis del ciclo 1, que será de al menos 200 mg o más). Con esta dosis baja, se espera FC no lineal y esto permitirá la cuantificación de la TMDD en pacientes con cáncer. El valor de la dosis de preinclusión es que proporcionará un entendimiento de si, en la fase de extensión del ensayo (o estudios futuros), diferentes dosis pueden ser más eficaces en los diferentes brazos de extensión (es decir, diferentes neoplasias malignas) en base a factores demográficos y de referencia del paciente (incluyendo tipo, tamaño y estado inflamatorio tumorales). Puesto que se ha demostrado que el bloqueo de CSF-1R inhibe selectivamente los MAT, ofreciendo, por tanto, un potencial para prevenir o incluso revertir la quimiorresistencia mediada por MAT[10], se iniciará una evaluación simultánea del Mab 2F11 humanizado administrado en combinación con paclitaxel. Se eligió paclitaxel como quimioterapia recetada comúnmente para estos grupos de pacientes y no se espera que produzca una toxicidad solapante significativa, puesto que las toxicidades que se han informado más comúnmente con paclitaxel (mielodepresión, neurotoxicidad y artralgia o mialgia) no se han informado en estudios de toxicidad para una dosis fija de paclitaxel, administrado QW durante hasta 12 semanas, se investigará en combinación con dosis ascendentes de Mab 2F11 humanizado para pacientes con cáncer de mama u ovárico avanzado. Los datos recientes han demostrado que en pacientes con SVNP y TTCG se detecta la sobreexpresión de CSF-1 y está mediada, en parte, por una translocación que implica el gen CSF-1R en un 30-60 % de los casos. Además, se ha demostrado que la presencia de macrófagos positivos para CSF-1R en varios cánceres humanos (tales como carcinoma ovárico y de mama) se correlaciona no solo con una densidad vascular incrementada, sino también con un peor resultado clínico. En el cáncer de mama, la presencia de una firma génica de respuesta a CSF-1 predice el riesgo de recidiva y metástasis. En base a estos hallazgos y los modelos preclínicos, parece razonable someter a prueba la hipótesis de que el bloqueo de los macrófagos asociados a tumores y su bioactividad protumoral con Mab 2F11 humanizado solo o en combinación con paclitaxel tiene el potencial de mostrar actividad clínica en pacientes con determinados tipos de tumores sólidos.

Este estudio contiene una serie de extracciones de sangre para la evaluación de los parámetros FC y FD, así como la recogida obligatoria de tejido tumoral reciente y de archivo. Estos son importantes para posibilitar un entendimiento completo de las propiedades FC, el mecanismo de acción y el potencial de los biomarcadores pronóstico de la respuesta.

45 3.1.4 Fundamento de la evaluación de biomarcadores

Los biomarcadores tienen el potencial de conformar estrategias de diagnóstico e influir en el abordaje terapéutico. En el futuro, los biomarcadores pueden promover un enfoque de genómica personalizada, agrupando a los pacientes por las firmas moleculares de sus tumores y de los marcadores en la sangre, en lugar de por el tipo de cáncer. Se concentran los esfuerzos en la identificación de biomarcadores pronóstico, que proporcionan información sobre la probable eficacia y seguridad del tratamiento. Para evaluar la FD y el/los efecto/s farmacodinámico/s de un fármaco sobre el tumor, a menudo se requiere una biopsia del tumor.

55 3.1.4.1 Fundamento de la biopsia de tumores en fresco de pretratamiento y durante el tratamiento

La infiltración y diferenciación de MAT es dependiente del micromedio tumoral respectivo en lesiones primarias y metastásicas. Además, el estado inmunitario respectivo y el pretratamiento del paciente pueden influir en el microambiente tumoral del paciente. Por lo tanto, todos los pacientes se someterán a una biopsia pretratamiento obligatoria para definir la infiltración de MAT y los niveles de expresión de CSF-1R en el valor de referencia, pero no se usarán para determinar la idoneidad del paciente para el ensayo. Además, las biopsias obligatorias durante el tratamiento permitirán la evaluación de la actividad FD del Mab 2F11 humanizado comparando los niveles previos y posteriores a la dosis. La aspiración con aguja fina (AAF) no será adecuada para sustituir a las biopsias de tumores, ya que la distribución de subpoblaciones de macrófagos se debe evaluar en el tejido.

El tejido tumoral de archivo no puede sustituir a las biopsias en fresco, ya que la infiltración y diferenciación de macrófagos es dependiente del micromedio. El micromedio tumoral puede ser variable en el tumor primario debido

al pretratamiento del paciente y también puede estar alterado en lesiones metastásicas. Sin embargo, si está disponible tejido tumoral de archivo, las muestras se usarán para la correlación retrospectiva de exploración de datos con biopsias en fresco.

5 3.1.4.2 Fundamento de las biopsias de piel herida

Las diferentes fases de la cicatrización requieren muchos procesos (por ejemplo, reclutamiento de neutrófilos, infiltración de macrófagos, angiogénesis (Eming, S.A. *et al.*, Prog. Histochem. Cytochem. 42 (2007) 115-170). Se han usado ensayos de heridas en la piel para obtener tejido sustituto para determinar los marcadores FD para, por ejemplo, tratamientos antiangiogénicos (Zhang, D. *et al.*, Invest. New Drugs 25 (2006) 49-55; Lockhart, A.C. *et al.*, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 586-593). Durante la cicatrización, los macrófagos desempeñan un papel sustancial y los cambios fenotípicos de los macrófagos asociados a heridas (MAH) explican los diferentes papeles en las fases de la reparación de la piel (por ejemplo, fase inflamatoria temprana=actividad fagocítica intensa; fase de remodelación del tejido medio: estado inmunorregulador con sobreexpresión de pro factores angiogénicos) (Adamson, R., Journal of Wound Care 18 (2009) 349-351; Rodero, M.P. *et al.*, Int. J. Clin. Exp. Pathol. 25 (2010) 643-653; Brancato, S.K. y Albina, J.E., Wound Macrophages as Key Regulators of Repair, Origin, Phenotype, and Function. AJP (2011), vol. 178, n.º 1).

De hecho, la ausencia de macrófagos dio como resultado una cicatrización retardada en ratones genomanipulados (Rodero, M.P. *et al.*, Int. J. Clin. Exp. Pathol. 25 (2010) 643-653). Los experimentos preclínicos mostraron una reducción de macrófagos (positivos para F4/80) significativa en la piel de un modelo de ratón de xenoinjerto MDA-MB231 tratado con anticuerpo frente al CSF-1R. Sin embargo, se ha informado de diferencias específicas de especie entre ratones y seres humanos (Daley, J.M. *et al.*, J. Leukoc. Biol. 87 (2009) 1-9).

Como los MAH y MAT se originan de las mismas células progenitoras y comparten funciones y fenotipos similares, se usarán biopsias de piel de pretratamiento y durante el tratamiento (total de n=4) en serie para analizar los efectos farmacodinámicos del tratamiento con Mab 2F11 humanizado en MAH durante el proceso de cicatrización. La correlación de los datos de la piel con los efectos FD del tratamiento con Mab 2F11 humanizado sobre MAT en biopsias de tumores en fresco puede incrementar significativamente el entendimiento sobre la base molecular de cómo funciona el Mab 2F11 humanizado y cómo responde el tumor.

Además, la evaluación del tejido de la piel herida podría sustituir potencialmente a las biopsias de tumores durante el tratamiento en ensayos posteriores y, por lo tanto, servir como tejido sustituto para evaluar la eficacia del Mab 2F11 humanizado.

35 3.1.4.3 Fundamento de las muestras de sangre completa para medir los marcadores FD

Estas muestras de tejido sustituto se usarán con propósitos de investigación para identificar biomarcadores que sean pronósticos de la respuesta al tratamiento con Mab 2F11 humanizado (en términos de dosis, seguridad y tolerabilidad) y ayudarán a entender mejor la patogenia, curso y resultado del cáncer y enfermedades relacionadas. El análisis puede incluir la determinación de marcadores en circulación asociados con la actividad FD del Mab 2F11 humanizado (por ejemplo, evaluación de los niveles de citocinas, células inmunitarias en circulación y disminución de las células efectoras inmunitarias). Los experimentos preclínicos han demostrado que los cambios, por ejemplo, en las subpoblaciones de monocitos y macrófagos tisulares con respecto a TRAP5b, CSF-1, en circulación se asocian con la actividad farmacológica. Además, los datos de GLP-Tox de macacos cangrejeros tratados con Mab 2F11 humanizado revelaron alteraciones en los biomarcadores óseos de formación (osteocalcina, P1NP), actividad osteoclástica (TRAP5b) y paratirina que se correlacionaron en conjunto con números de osteoclastos reducidos.

Por lo tanto, estos marcadores FD de exploración y factores inmunoestimuladores o inmunoinhibidores en circulación adicionales se evaluarán durante el estudio.

Criterios de respuesta tumoral

La respuesta tumoral se evaluará de acuerdo con los criterios RECIST 1.1. En este estudio, la respuesta tumoral se medirá usando TAC helicoidales (incluyendo una exploración torácica) o TAC. Las radiografías y ecografías no son aceptables para controlar las lesiones diana. Para cada sujeto, se deben usar el mismo procedimiento de evaluación y la misma técnica para evaluar cada lesión a lo largo de todo el estudio. Si se usa más de un procedimiento, seleccionar el procedimiento más exacto de acuerdo con RECIST cuando se registren los datos.

La respuesta tumoral se confirmará un mínimo de 4 semanas después de que se observó la respuesta inicial, o en la siguiente evaluación tumoral programada si se va a producir más de 4 semanas después de la respuesta inicial.

Se realizará una evaluación de la cinética del crecimiento tumoral comparando las exploraciones postratamiento con la última exploración previa al estudio disponible, si estuviera disponible.

65 Evaluaciones farmacocinéticas (FC)/farmacodinámicas (FD)

Se recogerán muestras de sangre para evaluar la farmacocinética FC y/o FD como se describe en la tabla a continuación

- 5 El volumen total de pérdida de sangre para las evaluaciones FC, hasta el final del ciclo 4, será aproximadamente de 58 ml para la parte I, brazo A, y la parte II y aproximadamente de 86 ml para la parte I, brazo B. En cada ciclo posterior, se extraerán 6 ml adicionales de sangre para las evaluaciones FC para cada grupo de tratamiento. El volumen total de pérdida de sangre para las evaluaciones FD hasta el final del ciclo 4 (8 semanas postratamiento) será aproximadamente de 161 ml. En cada ciclo posterior se recogerán 9 ml (1x5 ml, 1x2 ml y 2x1 ml; véase la tabla 10 2 para más detalles) de muestras de sangre adicionales para las evaluaciones FD predosis.

Evaluaciones FC

- 15 Se extraerá sangre para el análisis de las concentraciones de Mab 2F11 humanizado, anticuerpo antihumano humanizado (HAHA) con respecto a Mab 2F11 humanizado y paclitaxel. Además, se tomará una única muestra de sangre en el momento de una reacción relacionada con la infusión de magnitud significativa y si se interrumpe la infusión o la tasa de infusión se ralentiza a discreción del investigador.
- 20 Se medirán Mab 2F11 humanizado y HAHA séricos usando ensayos validados. También se analizarán todas las muestras de suero recogidas para la determinación de HAHA para RO5509554. Todas las muestras de sangre para la evaluación FC se recogerán de un catéter intravenoso diferente al que recibe la infusión. Las muestras destinadas a la exposición a Mab 2F11 humanizado y análisis de HAHA se dividirán en dos alícuotas separadas, una de cada para la determinación Mab 2F11 humanizado y HAHA.
- 25 Las concentraciones plasmáticas de paclitaxel se medirán usando un procedimiento validado de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM).

Evaluaciones FD

- 30 Se recogerán muestras para el descubrimiento y la validación de biomarcadores dinámicos (no heredados) y genéticos (heredados) de todos los sujetos que participan en el ensayo.

Muestras de sangre completa para FD y biomarcadores

- 35 Se extraerá sangre como tejido fuente para determinar los efectos FD del Mab 2F11 humanizado. Todas las muestras de sangre para la evaluación FD se recogerán de un catéter intravenoso diferente al que recibe la infusión. Las evaluaciones FD de muestras de sangre completa incluirán, pero no se limitan a:
- 40 • inmunofenotipado (subconjuntos de monocitos/macrófagos y linfocitos) usando citometría de flujo. Para los subconjuntos de monocitos/macrófagos, estos marcadores incluyen, pero no se limitan a, CD14, CD16, CD45, MHC de clase II, y para los linfocitos CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45, CD56.
- 45 • El volumen total de pérdida de sangre para las evaluaciones farmacodinámicas de poblaciones de monocitos/macrófagos y células de linfocitos será aproximadamente de 17x 5 ml=85 ml durante los primeros cuatro ciclos.
- Se usarán tres muestras de sangre adicionales para la preparación de suero para determinar los cambios relacionados con la FD de los marcadores solubles. Estos marcadores incluyen, pero no se limitan a:

50 Evaluación de citocinas A:

CSF-1, Trap5b, sCD163, IL-34

- 55 El volumen total de pérdida de sangre para las evaluaciones FD de citocinas A será aproximadamente de 25x 2 ml=50 ml durante los primeros cuatro ciclos.

Evaluación de citocinas B:

- 60 IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF, VEGF, MCP-1, CCL18, CCL22, MIP-1, galectina 3, IL1Ra, TGF-alfa

- El volumen total de pérdida de sangre para las evaluaciones FD de citocinas B será aproximadamente de 21x1 ml=21 ml durante los primeros cuatro ciclos.

65 Biomarcadores óseos:

Se evaluarán biomarcadores óseos tales como osteocalcina, P1NP y paratirina (PTH).

El volumen total de pérdida de sangre será aproximadamente de 5x 1 ml=5 ml durante los primeros cuatro ciclos.

- 5 La cantidad más grande de volumen total de pérdida de sangre por ciclo para las evaluaciones FD/con los biomarcadores será aproximadamente de 51 ml.

Biopsias de tejidos de la piel en cicatrización

- 10 Se analizará el tejido de la piel en cicatrización sustituto para determinar los análisis de biomarcadores FD de exploración asociados con el proceso de cicatrización, incluyendo, pero sin limitarse a, reclutamiento de neutrófilos, infiltración de macrófagos y angiogénesis (véase también a continuación).

- 15 Se tomarán dos muestras de piel emparejadas después de la anestesia local de áreas especulares de la piel normal (preferentemente localizadas en la espalda sin folículo pilosos). Se obtendrán usando un dispositivo de biopsia en sacabocados de 2 y 4 mm de diámetro para obtener 2 muestras solapantes, que no requerirán puntos de sutura.

- 20 La biopsia de 2 mm creará la lesión y la biopsia de 4 mm completamente solapante 7 días después recogerá el material de cicatrización.

- 25 El intervalo de tiempo elegido entre las 2 biopsias se considera adecuado, en base al entendimiento del curso temporal de los cambios en los biomarcadores pertinentes (reclutamiento de neutrófilos, infiltración de macrófagos, angiogénesis) asociados con el proceso de cicatrización (Eming, S.A. *et al.*, Prog. Histochem. Cytochem. 42 (2007) 115-170; Zhang, D. *et al.*, Invest. New Drugs 25 (2006) 49-55; Lockhart, A.C. *et al.*, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 586-593).

Todas las muestras de piel se someterán a análisis para:

- 30 • tinción con hematoxilina y eosina (H y E)
- Se analizarán los marcadores de inmunohistoquímica (IHQ) para los siguientes parámetros: CSF-1R, CD68/CD163, CD68/MHC de clase II, CD31 (densidad de microvasos) y Ki67.

- 35 Las muestras se fijarán con formol e incluirán en parafina y enviarán a un laboratorio central para su análisis.

Biopsias de tumores

Biopsias de tumores en fresco

- 40 Se recogerán biopsias de tumores en fresco de pretratamiento y durante el tratamiento para evaluar los cambios farmacodinámicos de la infiltración de MAT y marcadores tumorales adicionales (véase también anteriormente).

- 45 Las biopsias se deben tomar preferentemente de la lesión metastásica más grande, pueden ser del tumor primario o, si es posible, tanto del tumor primario como de un sitio metastásico y, si es posible, se deben biopsiar en la interfase tumor-estroma.

- 50 La recogida de biopsias de tumores se guiará por ecografía o TAC usando una aguja de calibre 18 para proporcionar cilindros de al menos 20 mm de longitud. Se obtendrán al menos 2, idealmente 4 biopsias con cilindro en cada punto de tiempo.

- La mitad de la muestra se fijará con formol y se incluirá en parafina. La otra mitad se congelará en fresco y se recogerá para su almacenamiento a largo plazo para el análisis de exploración retrospectivo de los biomarcadores (véase la sección 5.5.3.1.2).

- 55 Las muestras de biopsias fijadas con formol e incluidas en parafina se analizarán para:

- tinción con hematoxilina y eosina (H y E).
- 60 • Las evaluaciones de inmunohistoquímica (IHQ) incluyen, pero no se limitan a, los siguientes marcadores: CSF-1R, CD68/CD163, CD68/MHC de clase II, CD31 (densidad de microvasos), Ki67 y otros marcadores de exploración.

Modalidades de formación de imágenes para los biomarcadores

Ecografía con DCE

65

En base a los resultados preclínicos, se espera que el tratamiento con Mab 2F11 humanizado pueda modular la densidad de microvasos y la luz de los vasos en el tumor y de ahí la angiogénesis y el transporte transcápilar de nutrientes al tumor. Para controlar estos criterios de valoración, se propone usar ecografía con DCE como la opción de modalidad de formación de imágenes, siempre que sea posible.

FDG-PET

FDG-PET puede mejorar el abordaje de los pacientes identificando los paciente que responderán al tratamiento de forma temprana, antes de que se reduzca el tamaño tumoral; los pacientes que no responderán al tratamiento podrían abandonar el tratamiento en vano (Weber, W.A., J. Nucl. Med. 50 (2009) 1S-10S). Además, una reducción de la señal de FDG-PET dentro de los días o semanas de iniciar el tratamiento (por ejemplo, en cáncer de mama (Avril, N. *et al.*, J. Nucl. Med. 50 (2009) 55S-63S), ovárico (Schwarz, J.K. *et al.*, J. Nucl. Med. 50 (2009) 64S-73S) y de pulmón no microcítico (Zander, T. *et al.*, J. Clin. Oncol. (2011) 1701-1708)) se correlaciona significativamente con una supervivencia prolongada y otros criterios de valoración clínicos usados ahora. Los cambios inducidos por el tratamiento con Mab 2F11 humanizado en el metabolismo tumoral se pueden evaluar con FDG-PET. Además, la disminución de los macrófagos inducida por Mab 2F11 humanizado puede dar como resultado la disminución de SUV_{max} en exploraciones con FDG-PET.

Ejemplo 15

Inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CSF-1R en combinación con quimioterapia o inmunoterapia contra el cáncer en modelos de carcinoma de colon MC38 singénicos subcutáneos

Se cultivaron células de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal murino MC-38 (obtenida del Beckman Research Institute of the City of Hope, California, EE. UU.) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PAN Biotech) complementado con FCS al 10 % y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua a un 5 % de CO₂. En el día de la inoculación, se obtuvieron las células tumorales MC38 con PBS de matraces de cultivo y se transfirieron a un medio de cultivo, se centrifugaron, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Para la inyección de células, se ajustó el valor final a 1×10⁷ células/ml. Posteriormente, se inocularon 100 µl de esta suspensión (1×10⁶ células) por vía subcutánea en ratones hembra C57BL/6N de 7-9 semanas (obtenidos de Charles River, Sulzfeld, Alemania). Tratamiento con anticuerpo de control (MOPC-21; Bio X Cell, West Lebanon), mAb anti-CSF-1R murino, anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>, a una dosis por semana de 30 mg/kg i.p. solo o en combinación con IL-2 (Proleukin, Novartis, 100 000 UI/animal i.p. dos veces por día), o FOLFIRI (5-fluorouracilo, Medac, 100 mg/kg, i.p., 1x/ácido folínico, Pfizer, 40 mg/kg, i.p., 1x/irinotecán, HEXAL, 20 mg/kg, i.p., 1x) u oxaliplatino (Eloxatin, Sanofi-Aventis, 5 mg/kg, i.p. 1x) comenzó después de que se establecieron los tumores y hubieran alcanzado un tamaño promedio de 50 mm³. El volumen tumoral se midió dos veces por semana y los pesos de los animales se controlaron en paralelo. En un estudio separado con una configuración comparable, los tumores primarios de los grupos de tratamiento indicados se extirparon, pesaron y sometieron a análisis por FACS. Se recogió el material del tumor primario entre el día de estudio 20-25 como se indica. Para obtener suspensiones de células individuales susceptibles de análisis por citometría de flujo, los tumores se seccionaron en porciones pequeñas usando el cortador de tejidos Mcllwain. Posteriormente, las porciones tumorales se resuspendieron en medios RPMI complementados con colagenasa I, dispasa II y DNasa I, se incubaron a 37 °C y la suspensión de células se pasó a través de un macerado. Las células positivas para CD45 se enriquecieron por separación celular magnética de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi). En resumen, las células se marcaron con anticuerpo anti-CD45 de ratón conjugado con APC (BD, n.º de cat 559864) y se separaron con microesferas anti-APC. Para analizar los linfocitos T CD8+, estas células positivas para CD45 se tiñeron con 0,2 µg/ml de DAPI (Roche, n.º de cat 10222276001 y anticuerpo frente a CD8 conjugado con PE (n.º de cat. 12-0081-83 de eBioscience) o anticuerpo frente a CD4 conjugado con PE (eBioscience, n.º de cat. 2-0041-83). La adquisición de datos se realizó con FACS Canto II y posteriormente se analizó con el programa informático FlowJo. Solo se analizaron células viables (seleccionadas en células negativas para DAPI) para excluir los restos celulares y las células muertas.

La monoterapia con anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> inhibió el crecimiento de tumores primarios en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control (ICT: 61 %, PTC: 0,39 IC: 0,15-0,68). Además, la monoterapia con IL2 tuvo un efecto sobre el crecimiento de tumores primarios en MC38 (ICT: 47 %, PTC: 0,53 IC: 0,27-0,85). Además de anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> con respecto al tratamiento con IL-2 dio lugar a una eficacia antitumoral superior en comparación con el tratamiento con IL-2 solo (ICT: 78 %, PTC: 0,21 IC: 0,02-0,48). El tratamiento con el régimen quimioterapéutico con FOLFIRI también inhibió significativamente el crecimiento tumoral (ICT: 66 %, PTC: 0,34 IC: 0,11-0,61) y la adición de anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> dio lugar a un resultado mejorado adicional (ICT: 77 %, PTC: 0,23 IC: 0,001-0,48). El oxaliplatino también demostró una eficacia algo menos pronunciada sobre el crecimiento tumoral en MC38 (ICT: 46 %, PTC: 0,54 IC: 0,29-0,86) que, no obstante, se pudo potenciar por la combinación con el anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> (ICT: 69 %, PTC: 0,31 IC: 0,07-0,59). Al observar la progresión de los tumores individuales por encima de un tamaño de 700 mm³, la mediana del tiempo transcurrido hasta la progresión de los animales tratados con la combinación de anticuerpo

frente al <CSF-1R de ratón> con IL-2 fue superior a la combinación con quimioterapias en este modelo (véase la tabla 11).

Tabla 11:

Eficacia antitumoral de combinaciones de anticuerpos frente al <CSF1R de ratón> en el modelo *in vivo* de CRC de ratón MC38

Grupo	ICT (día 21)	PTC (día 21)	Mediana del tiempo transcurrido hasta la progresión VT > 700 mm ³
Control (IgG1 de ratón)	--		17
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>	61 %	0,39	21
Oxaliplatino	46 %	0,54	21
FOLFIRI	66 %	0,34	22
Proleucina	47 %	0,53	21
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>/Eloxatin	69 %	0,31	21
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>/FOLFIRI	77 %	0,23	27,5
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>/Proleukin	78 %	0,22	30

El análisis por citometría de flujo de tumores tratados con <anticuerpo frente al CSF-1R de ratón> reveló un incremento en 3 veces de los números de linfocitos T CD8+ en comparación con la monoterapia con oxaliplatino, así como un ligero incremento de los linfocitos T CD4+. Los tumores tratados con la combinación de anticuerpo neutralizante frente al CSF-1R y oxaliplatino mostraron un incremento comparable de los linfocitos T cuando se trataron solo con anticuerpo. Se obtuvieron resultados similares para la combinación con FOLFIRI. Los resultados también se muestran en la figura 5.

Ejemplo 16

Inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CSF-1R en combinación con anticuerpo monoclonal anti-CD40 en el modelo de carcinoma de colon MC38 singénico subcutáneo

Se cultivaron células de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal murino MC-38 (obtenida del Beckman Research Institute of the City of Hope, California, EE. UU.) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PAN Biotech) complementado con FCS al 10 % y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua a un 5 % de CO₂. En el día de la inoculación, se obtuvieron las células tumorales MC38 con PBS de matraces de cultivo y se transfirieron a un medio de cultivo, se centrifugaron, se lavaron una vez y se resuspendieron en PBS. Para la inyección de células, se ajusta el valor final a 1×10⁷ células/ml. Posteriormente, se inocularon 100 µl de esta suspensión (1×10⁶ células) por vía subcutánea en ratones hembra C57BL/6N de 6-10 semanas. Se trataron grupos de animales con anticuerpos de control (MOPC-21 (30 mg/kg i.p. una vez por semana) y 2A3 (100 µg i.p. una vez); Bio X Cell, West Lebanon), mAb anti-CSF-1R murino, anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>, (30 mg/kg i.p. una vez por semana) solo o en combinación con el anticuerpo monoclonal anti-CD40 FGK45 (mAb anti-IgG2a de ratón de rata frente a CD40 agonista FGK45 (S. P. Schoenberger, *et al*, Nature, 393, 480 (1998), disponible de BioXcell) CD40 (FGK45)) (100 µg, i.p., 1x). El tratamiento comenzó después de que se establecieron los tumores y hubieran alcanzado un tamaño promedio de 50 mm³. El volumen tumoral se midió dos veces por semana y los pesos de los animales se controlaron en paralelo. Los resultados se muestran en la figura 7. La combinación de mAb frente al CSF1R + mAb frente a CD40 FGK45 muestra eficacia antitumoral mejorada sobre las monoterapias en el modelo de cáncer de colon de ratón MC38 singénico.

Ejemplo 17

Inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-CSF-1R en combinación con anticuerpo monoclonal anti-Ang2/VEGF y/o FOLFIRI en el modelo de carcinoma de colon MC38 singénico subcutáneo

Se cultivan células de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal murino MC-38 (obtenida del Beckman Research Institute of the City of Hope, California, EE. UU.) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PAN Biotech) complementado con FCS al 10 % y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua a un 5 % de CO₂. En el día de la inoculación, se obtienen las células tumorales MC38 con PBS de matraces de cultivo y se transfieren a un medio de cultivo, se centrifugan, se lavan una vez y se resuspenden en PBS. Para la inyección

de células, se ajusta el valor final a 1×10^7 células/ml. Posteriormente, se inoculan 100 μ l de esta suspensión (1×10^6 células) por vía subcutánea en ratones hembra C57BL/6N de 7 semanas. El tratamiento con anticuerpo de control (MOPC-21; Bio X Cell, West Lebanon), mAb anti-CSF-1R murino, anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>, a una dosis por semana de 30 mg/kg i.p. solo o en combinación con FOLFIRI (5-fluorouracilo, Medac, 100 mg/kg, i.p., 1x/ácido folínico, Pfizer, 40 mg/kg, i.p., 1x/irinotecán, HEXAL, 20 mg/kg, i.p., 1x) o anticuerpo monoclonal anti-Ang2/VEGF (el anticuerpo frente a ANG-2-VEGF X Mab1 biespecífico como se describe en el documento WO2011/117329) (10 mg/kg, i.p., 1x por semana) comienza después de que se establezcan los tumores y hayan alcanzado un tamaño promedio de 50 mm³. El triple tratamiento de combinación se realiza como se describe en la tabla 13. El volumen tumoral se mide dos veces por semana y los pesos de los animales se controlan en paralelo.

La monoterapia con anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>, anticuerpo anti-Ang2/VEGF o FOLFIRI inhibió mínimamente el crecimiento de tumores primarios en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control (ICT: 28 %, 35 % u 11 %, respectivamente). La combinación de anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> con anticuerpo anti-Ang2/VEGF o bien FOLFIRI dio lugar a una eficacia antitumoral más pronunciada y estadísticamente significativa en comparación con el anticuerpo de control (ICT: 64 % o 67 %). El triple tratamiento de combinación de anticuerpo frente al <CSF-1R de ratón> con FOLFIRI seguido del tratamiento con el anticuerpo anti-Ang2/VEGF 2 días o 9 días después de esto mostró la mejor actividad antitumoral (ICT: 68 % o 70 %). El tratamiento simultáneo de los 3 compuestos o combinación del anticuerpo anti-Ang2/VEGF con FOLFIRI seguido del tratamiento con anticuerpo frente al <CSF-1R de ratón> 9 días después de esto tan solo proporcionó una actividad antitumoral de un 61 % o 56 %, respectivamente. Al observar la progresión de los tumores individuales por encima de un tamaño de 700 mm³, la mediana del tiempo transcurrido hasta la progresión de los animales tratados con la combinación de anticuerpo frente al <CSF-1R de ratón> con FOLFIRI seguido de tratamiento con el anticuerpo anti-Ang2/VEGF 2 días o 9 días después de esto también fue superior a la mediana del tiempo transcurrido hasta la progresión de todos los demás tratamientos en este modelo (véase la tabla 12).

Tabla 13:

Eficacia antitumoral del anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> en combinación con anticuerpo monoclonal anti-Ang2/VEGF y/o FOLFIRI en el modelo *in vivo* de CCR de ratón MC38

Grupo	ICT (día 20)	PTC (día 20)	Mediana del tiempo transcurrido hasta la progresión VT > 700 mm ³
Control (IgG1 de ratón)	---	---	20
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>	28 %	0,72	22
anticuerpo anti-Ang2/VEGF	35 %	0,65	23
FOLFIRI	11 %	0,84	20
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>/FOLFIRI	67 %	0,34	26
anticuerpo anti-Ang2/VEGF/FOLFIRI	43 %	0,52	24
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>/anticuerpo anti-Ang2/VEGF	64 %	0,35	27
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón>/FOLFIRI/anticuerpo anti-Ang2/VEGF; tratamiento simultáneo	61 %	0,39	26
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> (día 7)/FOLFIRI/anticuerpo anti-Ang2/VEGF (día 9)	68	0,27	28
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> (día 7)/FOLFIRI/anticuerpo anti-Ang2/VEGF (día 16)	70 %	0,22	28
anticuerpo frente al <CSF1R de ratón> (día 16)/FOLFIRI/anticuerpo anti-Ang2/VEGF (día 7)	56	0,43	26

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Politerapia de anticuerpos frente al CSF-1R humano y usos de los mismos

<130> 30886 WO

5 <150> EP12158519.4
<151> 8-3-2012

<160> 91

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1
Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

15 <210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
20 1 5 10 15

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

25 <400> 3
Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 753 756 T3

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

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

<400> 5
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 7
 15 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 753 756 T3

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

5 <400> 8
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Gly Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 9
 Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp
 1 5

<210> 10
 <211> 16

15 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met Ser
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 11
 Ser Phe Asp Ile Ser
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

10 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

15 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14
 Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser
 20 1 5 10

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

25 <400> 15

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

10 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 17

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val

5 1 5

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11

<400> 18

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

1 5 10 15

<210> 19

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

20 <400> 19

Thr Tyr Asp Ile Ser

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11

<400> 20

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr

1 5

30 <210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 21

5 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

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

<400> 22

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser

1 5 10

<210> 23

15 <211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

20 <400> 23

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8

<400> 25
 Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

10 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8

15 <400> 26
 Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

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

<400> 27
 Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

25 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8

<400> 28
 Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

ES 2 753 756 T3

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

5 <220>
 <223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8

<400> 29
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 30
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

15 <400> 30
 Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 31
 <211> 116
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

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

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

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

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

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

ES 2 753 756 T3

50

55

60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7

<400> 33
 Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

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

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

<400> 34
 Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly
 10 1 5 10 15

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

15 <220>
 <223> CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7

<400> 35
 Ser Tyr Asp Ile Ser
 1 5

<210> 36
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

25 <400> 36
 Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

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

ES 2 753 756 T3

<400> 37

Ala Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 38

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 38

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

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

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

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

20 <211> 106

ES 2 753 756 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

5 <400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12

<400> 41

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

15 <210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12

<400> 42

ES 2 753 756 T3

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

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12

<400> 43

	Thr	Tyr	Asp	Ile	Ser
	1			5	

10 <210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12

<400> 44

	Gly	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	Pro	Thr
	1			5				

<210> 45

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12

<400> 45

	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser
	1			5			

25 <210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12

<400> 46

ES 2 753 756 T3

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

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-f12

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-f12

<400> 48

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 49

10 Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1

<400> 50

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 51

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1

<400> 51

Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

5 <210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1

<400> 52

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 53

<211> 7

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1

<400> 53

20 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1

<400> 54

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

<210> 55

30 <211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 753 756 T3

<220>

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

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 56

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

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

<400> 56

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

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

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

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

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

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

<210> 58

10 <211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 753 756 T3

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 59

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 59

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

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

ES 2 753 756 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

ES 2 753 756 T3

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

5 <400> 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 61

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 61

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

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

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

ES 2 753 756 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 62

ES 2 753 756 T3

<211> 972

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg

ES 2 753 756 T3

180						185						190					
Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Val	Ile	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Val		
		195					200					205					
Pro	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Gln	Ile	Val	Cys		
		210				215					220						
Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Asp	Val	Asn	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Gln	His	Asn		
225					230					235			240				
Asn	Thr	Lys	Leu	Ala	Ile	Pro	Gln	Gln	Ser	Asp	Phe	His	Asn	Asn	Arg		
				245					250					255			
Tyr	Gln	Lys	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	His		
			260					265					270				
Ala	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Gln	Gly	Lys	His	Ser		
		275					280					285					
Thr	Ser	Met	Phe	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Asn	Leu	Ser		
		290				295					300						
Ser	Glu	Gln	Asn	Leu	Ile	Gln	Glu	Val	Thr	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Asn		
305					310					315			320				
Leu	Lys	Val	Met	Val	Glu	Ala	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Asn	Trp		
			325						330					335			
Thr	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Glu	Pro	Lys	Leu	Ala		
			340					345					350				
Asn	Ala	Thr	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu		
		355					360					365					
Pro	Arg	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg		
		370				375					380						
Asn	Pro	Gly	Gly	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr		
385					390					395			400				
Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr		
				405					410					415			
Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	Val	Thr	Trp	Leu		
			420					425					430				

ES 2 753 756 T3

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
 435 440 445
 Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
 450 455 460
 Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
 465 470 475 480
 Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
 485 490 495
 Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
 515 520 525
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
 530 535 540
 Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
 545 550 555 560
 Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
 565 570 575
 Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
 580 585 590
 Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
 595 600 605
 Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
 610 615 620
 Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
 625 630 635 640
 Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
 645 650 655
 Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
 660 665 670
 Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
 675 680 685

ES 2 753 756 T3

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
 690 695 700
 Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
 705 710 715 720
 Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
 725 730 735
 Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
 740 745 750
 Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
 755 760 765
 Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
 770 775 780
 Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
 785 790 795 800
 Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
 805 810 815
 Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
 820 825 830
 Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
 835 840 845
 Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
 850 855 860
 Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
 865 870 875 880
 Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
 885 890 895
 Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
 900 905 910
 Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
 915 920 925
 Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
 930 935 940
 Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
 945 950 955 960
 Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
 965 970

<210> 63

<211> 972

ES 2 753 756 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

5 <400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
 420 425 430

ES 2 753 756 T3

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

ES 2 753 756 T3

675					680					685					
Pro	Gly	Gln	Asp	Pro	Glu	Gly	Gly	Val	Asp	Tyr	Lys	Asn	Ile	His	Leu
690					695					700					
Glu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg	Arg	Asp	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Gln	Gly	Val
705					710					715					720
Asp	Thr	Tyr	Val	Glu	Met	Arg	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Ser	Asn	Asp	Ser
				725					730					735	
Phe	Ser	Glu	Gln	Asp	Leu	Asp	Lys	Glu	Asp	Gly	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu
			740					745					750		
Arg	Asp	Leu	Leu	His	Phe	Ser	Ser	Gln	Val	Ala	Gln	Gly	Met	Ala	Phe
		755					760					765			
Leu	Ala	Ser	Lys	Asn	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Val	Ala	Ala	Arg	Asn	Val
	770					775					780				
Leu	Leu	Thr	Asn	Gly	His	Val	Ala	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala
	785					790					795				800
Arg	Asp	Ile	Met	Asn	Asp	Ser	Asn	Tyr	Ile	Val	Lys	Gly	Asn	Ala	Arg
				805					810					815	
Leu	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Ser	Ile	Phe	Asp	Cys	Val	Tyr
			820					825					830		
Thr	Val	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile
		835					840						845		
Phe	Ser	Leu	Gly	Leu	Asn	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Lys
		850				855					860				
Phe	Tyr	Lys	Leu	Val	Lys	Asp	Gly	Tyr	Gln	Met	Ala	Gln	Pro	Ala	Phe
	865					870					875				880
Ala	Pro	Lys	Asn	Ile	Tyr	Ser	Ile	Met	Gln	Ala	Cys	Trp	Ala	Leu	Glu
			885						890					895	
Pro	Thr	His	Arg	Pro	Thr	Phe	Gln	Gln	Ile	Cys	Ser	Phe	Leu	Gln	Glu
			900					905					910		
Gln	Ala	Gln	Glu	Asp	Arg	Arg	Glu	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asn	Leu	Pro	Ser
		915					920					925			
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	Phe	Gln	Phe	Cys				
			965						970						

ES 2 753 756 T3

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

5 <220>
 <223> dominio extracelular de CSF-1R humano

<400> 64
 Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
 20 25 30
 Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
 35 40 45
 Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
 50 55 60
 Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
 65 70 75 80
 Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
 85 90 95
 Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
 100 105 110
 Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
 115 120 125
 Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
 130 135 140
 Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
 145 150 155 160
 Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val

ES 2 753 756 T3

165										170				175			
Gln	Lys	Val	Ile	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	Glu		
			180				185						190				
Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Gln	Ile	Val	Cys	Ser	Ala	Ser		
		195				200					205						
Ser	Val	Asp	Val	Asn	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Asn	Thr	Lys		
		210				215				220							
Leu	Ala	Ile	Pro	Gln	Gln	Ser	Asp	Phe	His	Asn	Asn	Arg	Tyr	Gln	Lys		
225					230					235			240				
Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	His	Ala	Gly	Asn		
			245					250					255				
Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Gln	Gly	Lys	His	Ser	Thr	Ser	Met		
			260					265					270				
Phe	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	Gln		
		275					280					285					
Asn	Leu	Ile	Gln	Glu	Val	Thr	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Lys	Val		
		290					295					300					
Met	Val	Glu	Ala	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Asn	Trp	Thr	Tyr	Leu		
305					310					315					320		
Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Glu	Pro	Lys	Leu	Ala	Asn	Ala	Thr		
			325					330						335			
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu	Pro	Arg	Leu		
			340					345					350				
Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Pro	Gly		
		355					360					365					
Gly	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Pro	Pro	Glu		
		370		375						380							
Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Leu	Cys		
385					390					395					400		
Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	Val	Thr	Trp	Leu	Gln	Cys	Ser		
			405					410						415			

ES 2 753 756 T3

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> 65

<211> 388

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> fragmento de CSF-1R humano delD4

<400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 753 756 T3

130						135										140
Ile	His	Arg	Ala	Lys	Phe	Ile	Gln	Ser	Gln	Asp	Tyr	Gln	Cys	Ser	Ala	
145					150					155					160	
Leu	Met	Gly	Gly	Arg	Lys	Val	Met	Ser	Ile	Ser	Ile	Arg	Leu	Lys	Val	
				165					170					175		
Gln	Lys	Val	Ile	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	Glu	
			180					185					190			
Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Gln	Ile	Val	Cys	Ser	Ala	Ser	
		195					200					205				
Ser	Val	Asp	Val	Asn	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Asn	Thr	Lys	
	210					215					220					
Leu	Ala	Ile	Pro	Gln	Gln	Ser	Asp	Phe	His	Asn	Asn	Arg	Tyr	Gln	Lys	
225					230					235					240	
Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	His	Ala	Gly	Asn	
				245					250					255		
Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Gln	Gly	Lys	His	Ser	Thr	Ser	Met	
			260					265					270			
Phe	Phe	Arg	Tyr	Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	
		275					280					285				
Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	
	290					295					300					
Val	Thr	Trp	Leu	Gln	Cys	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	
305					310					315					320	
Gln	Val	Leu	Gln	Val	Trp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	
				325					330					335		
Glu	Pro	Phe	His	Lys	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	
			340					345					350			
Leu	Glu	His	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Ala	His	Asn	Ser	Val	Gly	
		355					360					365				
Ser	Gly	Ser	Trp	Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	His	Thr	His	
	370					375					380					
Pro	Pro	Asp	Glu													
385																

<210> 66
 <211> 292
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 753 756 T3

<220>

<223> fragmento de CSF-1R humano D1-D3

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser

ES 2 753 756 T3

195

200

205

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

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

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

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

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

Asn Leu Ile Gln
290

<210> 67

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> péptido señal

<400> 67

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

Trp His Gly Gln Gly
20

10 <210> 68

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 68

cacctccatg ttcttccggt acccccccaga ggtaag

36

<210> 69

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 753 756 T3

<400> 69
 Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 70
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 70
 Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
 1 5 10 15

10 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 71
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Ile Ser
 1 5 10

15 <210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 72
 Gly Gln Ser Phe Thr Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 73
 Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 74
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus

<400> 74
 Lys Ala Ser Glu Asp Val Gly Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

ES 2 753 756 T3

<210> 75
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<210> 76
 <211> 106
 <212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 76
 Lys Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asp Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

ES 2 753 756 T3

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

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

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 77

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 78

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

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

<210> 79

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

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

20 <210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
25 1 5

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 81

ES 2 753 756 T3

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 82

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

<210> 83

<211> 116

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 84

15 <211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

ES 2 753 756 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 85

<211> 218

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> dominios D4-D5 del fragmento de CSF-1R humano

<400> 85

Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln Asn Leu Ile
1 5 10 15

Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val Met Val Glu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu Gly Pro Phe
35 40 45

Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr Thr Lys Asp
50 55 60

Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu Lys Pro Ser
65 70 75 80

Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly Gly Trp Arg
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Val
100 105 110

Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys Ala Ala Ser
115 120 125

10

ES 2 753 756 T3

Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser Gly His Thr
130 135 140

Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp Asp Pro Tyr
145 150 155 160

Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr Val Gln Ser
165 170 175

Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr Glu Cys Arg
180 185 190

Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile Pro Ile Ser
195 200 205

Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
210 215

<210> 86

<211> 554

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 86

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

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

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

ES 2 753 756 T3

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Val	Phe	Asn	Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu
145					150					155					160

Asp	Lys	Asp	Trp	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn	Cys	Asn	Asn	Ser	Phe	Ala
				165					170					175	

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
290 295 300

Pro	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Glu	Ala	Ser	Glu	Ile	Pro	Val	Pro	Gln	Gly
305					310					315					320

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
355 360 365

Arg	Val	Gly	Pro	Val	Arg	Pro	Thr	Gly	Gln	Asp	Trp	Asn	His	Thr	Pro
	370					375					380				

ES 2 753 756 T3

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Phe Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
545 550

<210> 87

<211> 242

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 87

Met Pro Arg Gly Phe Thr Trp Leu Arg Tyr Leu Gly Ile Phe Leu Gly
1 5 10 15

Val Ala Leu Gly Asn Glu Pro Leu Glu Met Trp Pro Leu Thr Gln Asn
20 25 30

Glu Glu Cys Thr Val Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg
35 40 45

ES 2 753 756 T3

Ser Arg Leu Gln Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Lys Ile
50 55 60

Ser Val Pro Tyr Glu Gly Val Phe Arg Ile Ala Asn Val Thr Arg Leu
65 70 75 80

Gln Arg Ala Gln Val Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu
85 90 95

Val Ser Leu Ser Ala Thr Glu Ser Val Gln Asp Val Leu Leu Glu Gly
100 105 110

His Pro Ser Trp Lys Tyr Leu Gln Glu Val Glu Thr Leu Leu Leu Asn
115 120 125

Val Gln Gln Gly Leu Thr Asp Val Glu Val Ser Pro Lys Val Glu Ser
130 135 140

Val Leu Ser Leu Leu Asn Ala Pro Gly Pro Asn Leu Lys Leu Val Arg
145 150 155 160

Pro Lys Ala Leu Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr
165 170 175

Cys Ser Cys Cys Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu
180 185 190

Val Pro Ser Pro Gln Ser Cys Ser Pro Glu Pro Ser Leu Gln Tyr Ala
195 200 205

Ala Thr Gln Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Trp Ser Pro Ser Ser Pro Pro
210 215 220

His Ser Thr Gly Ser Val Arg Pro Val Arg Ala Gln Gly Glu Gly Leu
225 230 235 240

Leu Pro

<210> 88

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 88

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

ES 2 753 756 T3

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 89

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

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

Tyr Thr Ala Ser Thr 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 Ala Asn Ile Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 90

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 753 756 T3

<220>

<223> variante de dominio variable de la cadena pesada de S2C6 humanizado

<400> 90

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

5 <210> 91

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> variante de dominio variable de la cadena ligera de S2C6 humanizado

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

ES 2 753 756 T3

[illegible]

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une al CSF-1R humano para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el anticuerpo anti-CSF-1R se administra en combinación con un anticuerpo frente a CD40 agonista.

5

2. El anticuerpo que se une al CSF-1R humano para su uso de acuerdo con la reivindicación 1

i) en el que el anticuerpo anti-CSF-1R comprende (a) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:39 y (b) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:40; y

10

ii) en el que el anticuerpo frente a CD40 agonista comprende (a) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 88 y (b) una secuencia de aminoácidos de dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 89.

15

Fig. 1a

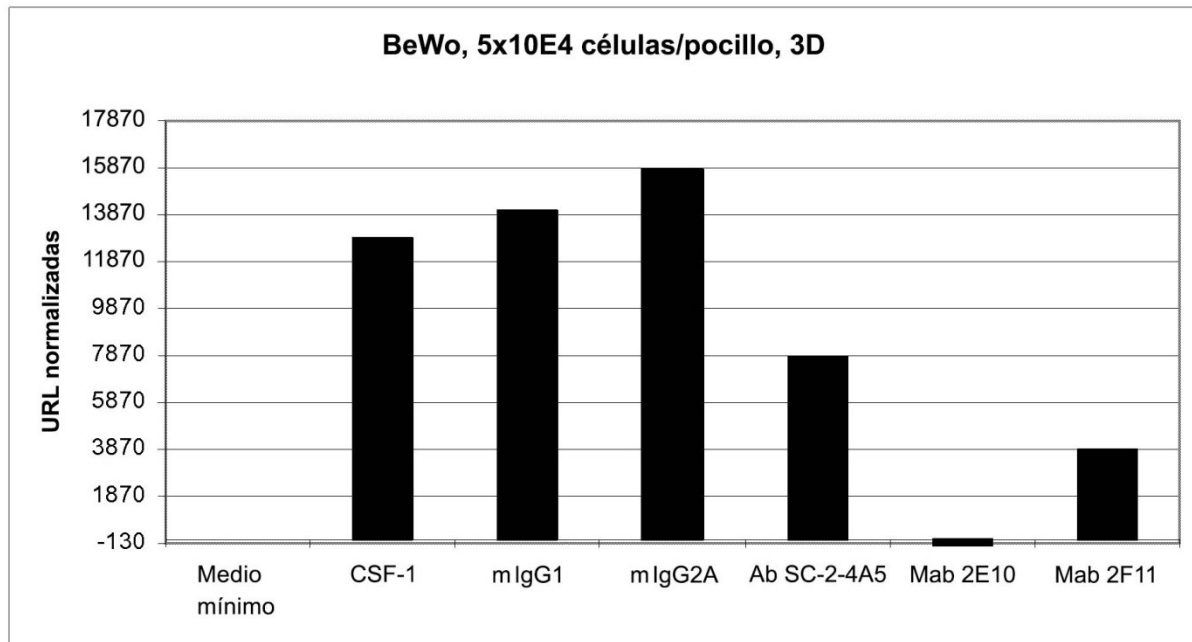


Fig. 1b

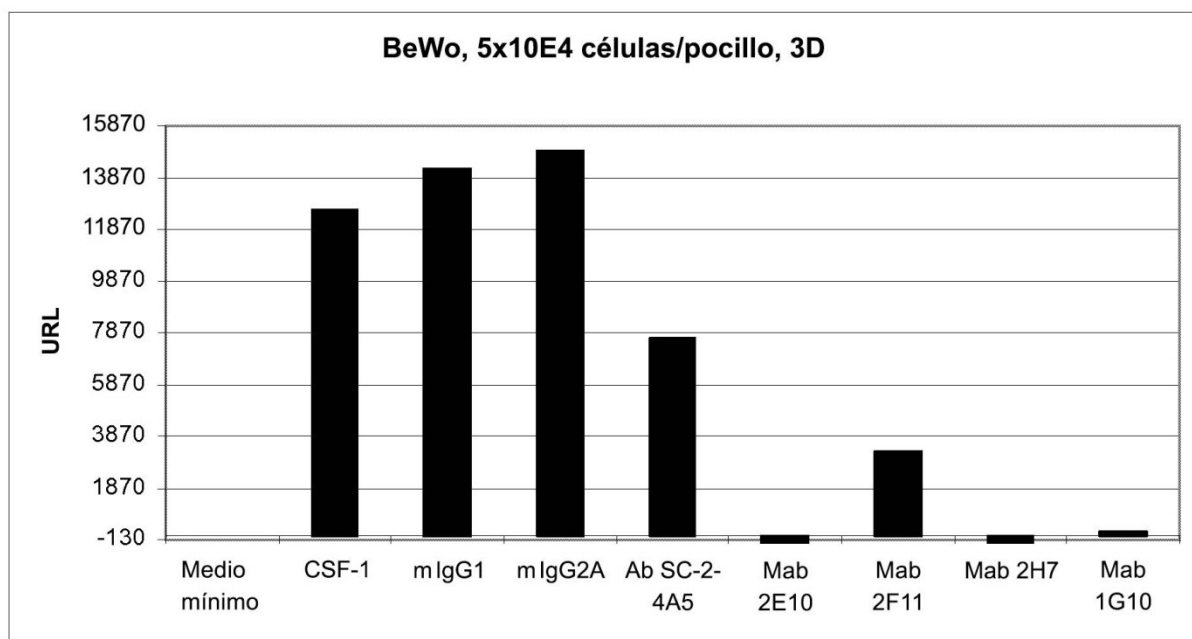


Fig. 2a

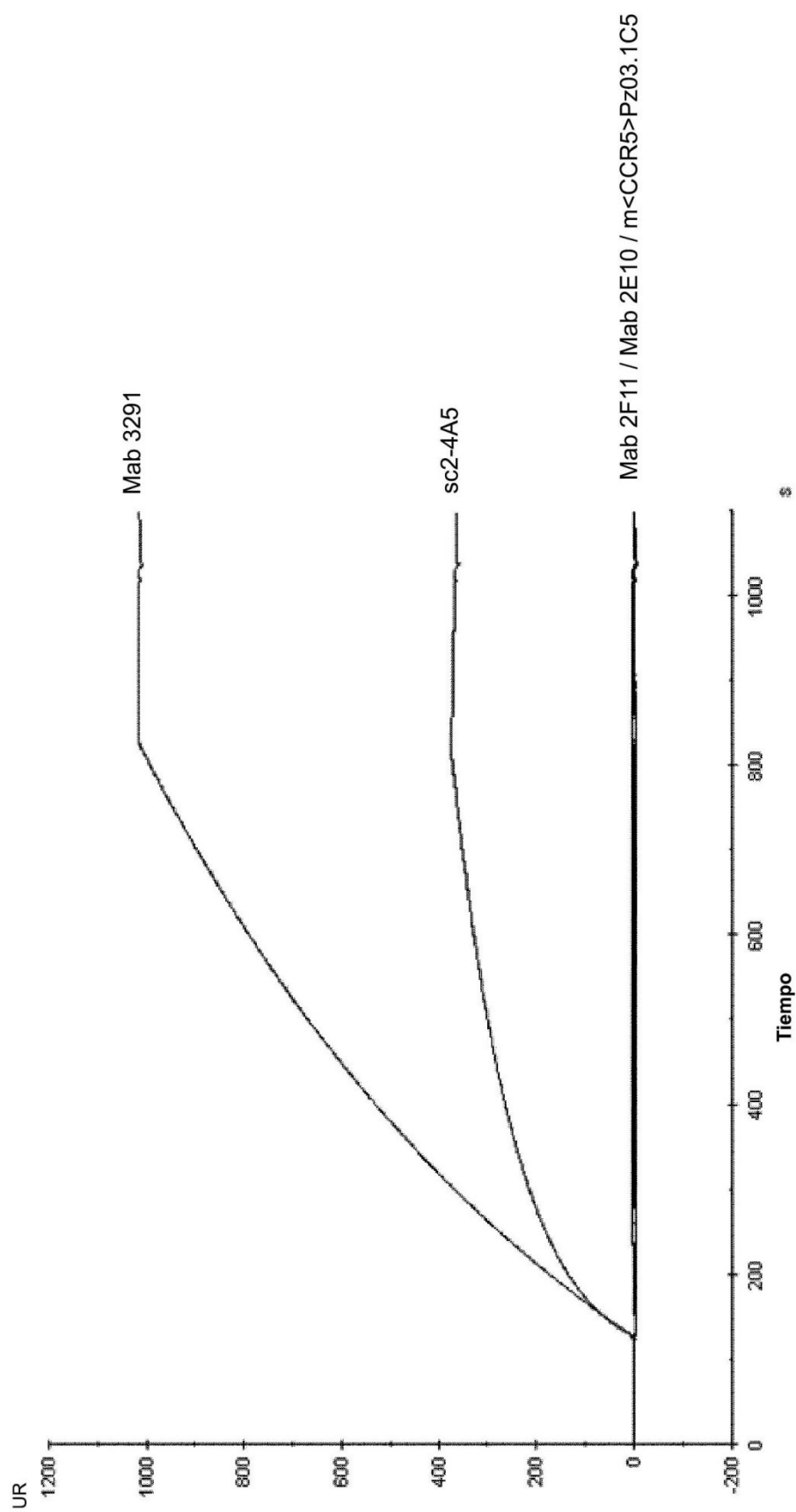


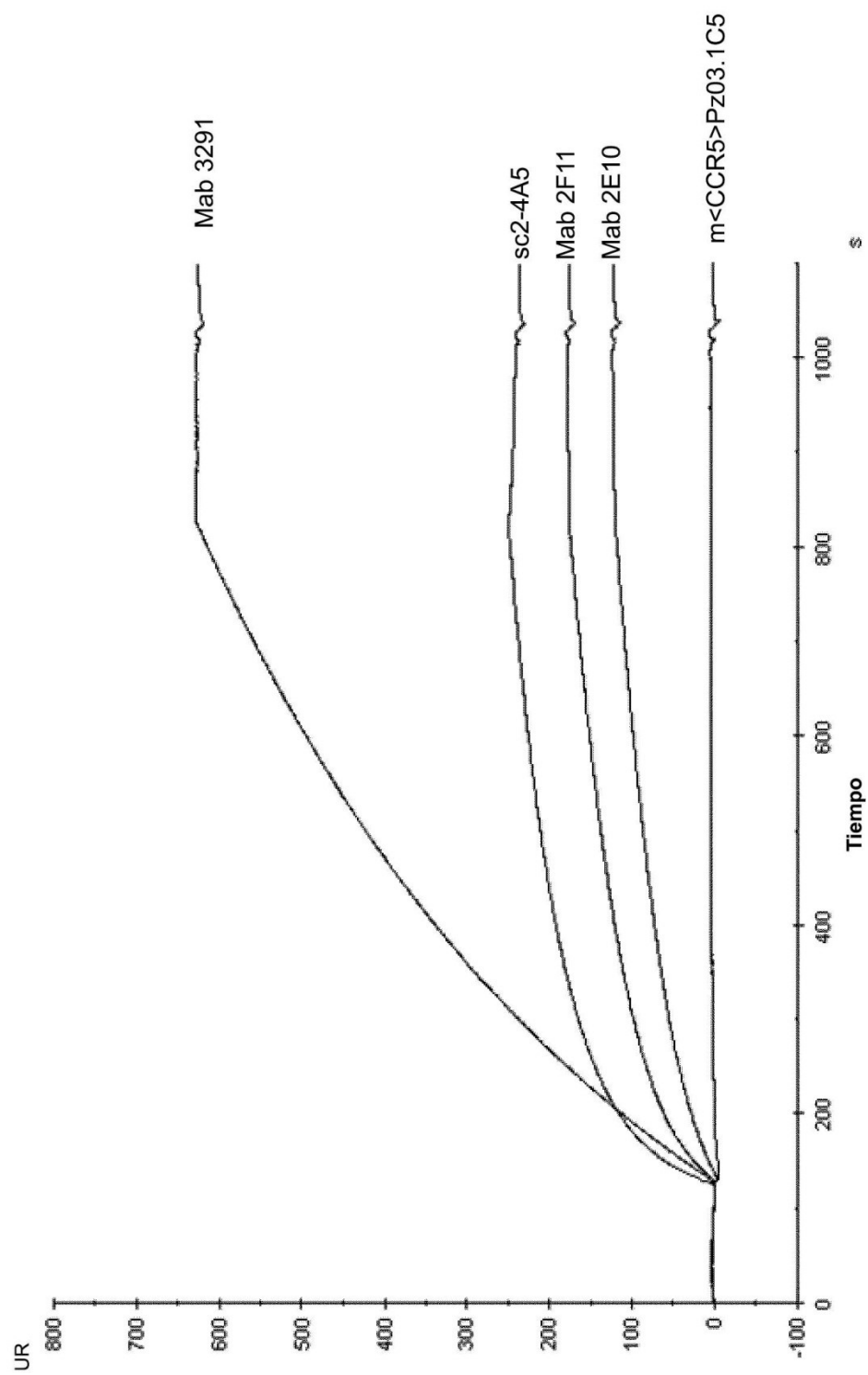
Fig. 2b

Fig. 2c

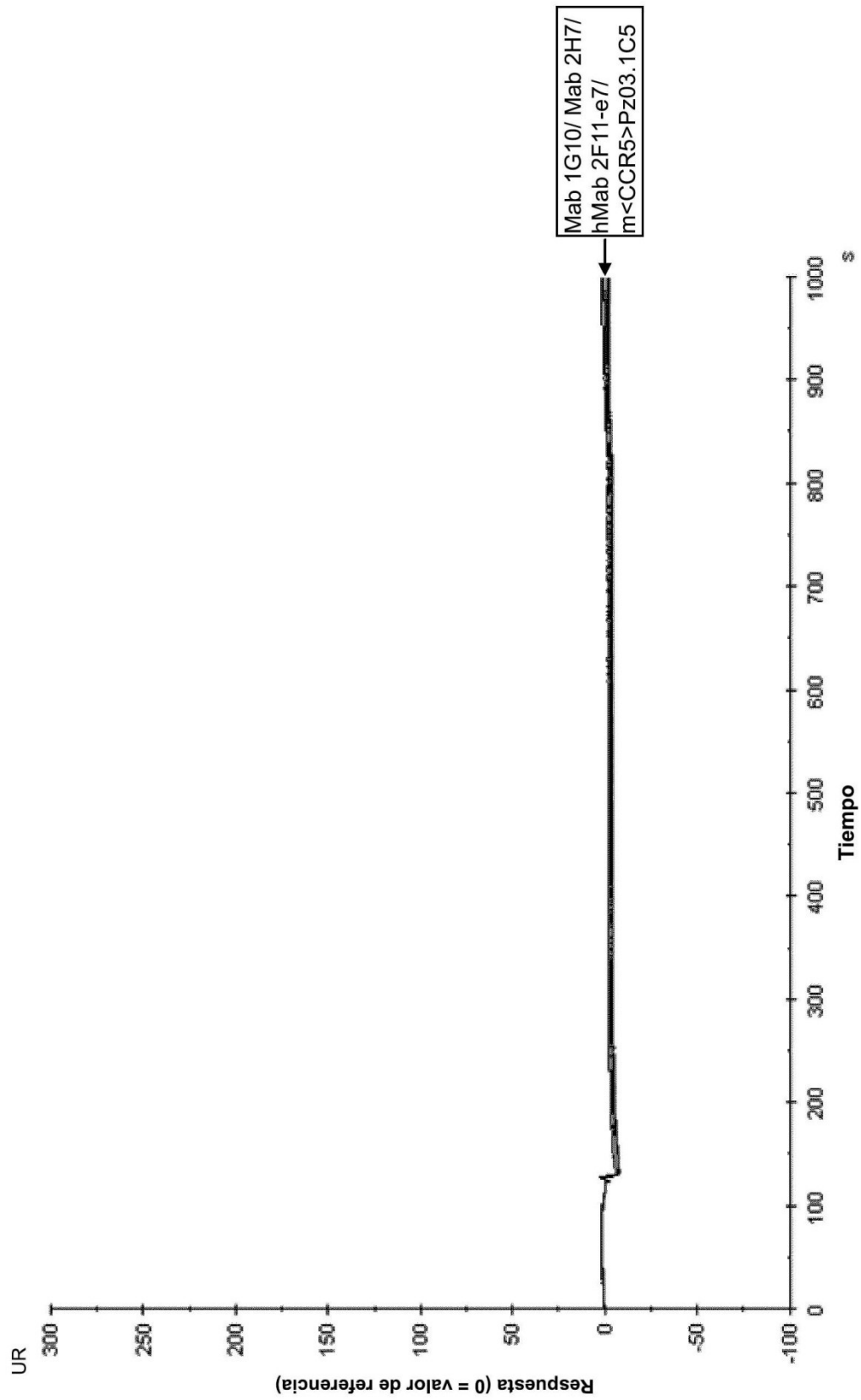


Fig. 2d

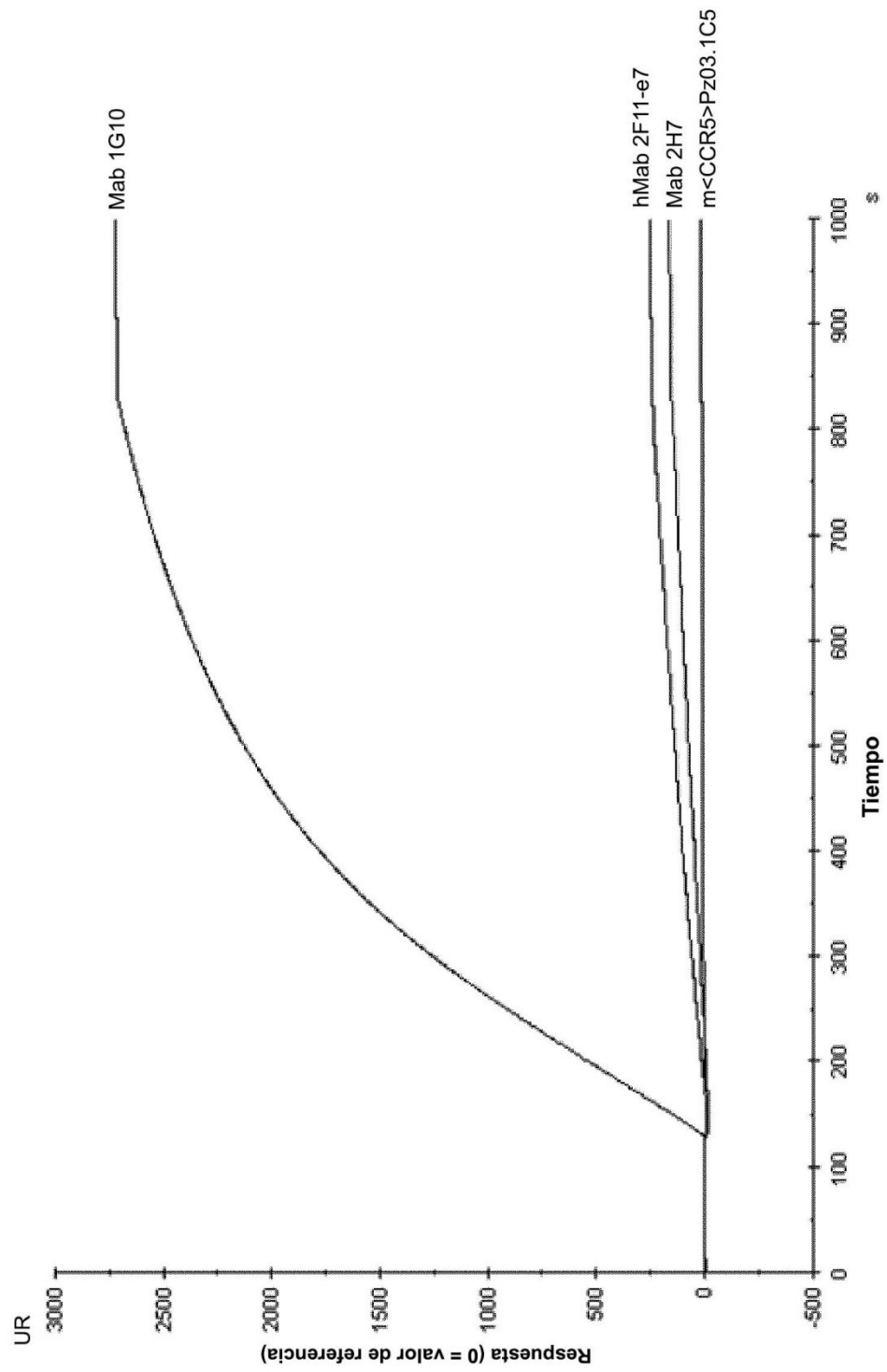


Fig. 2e

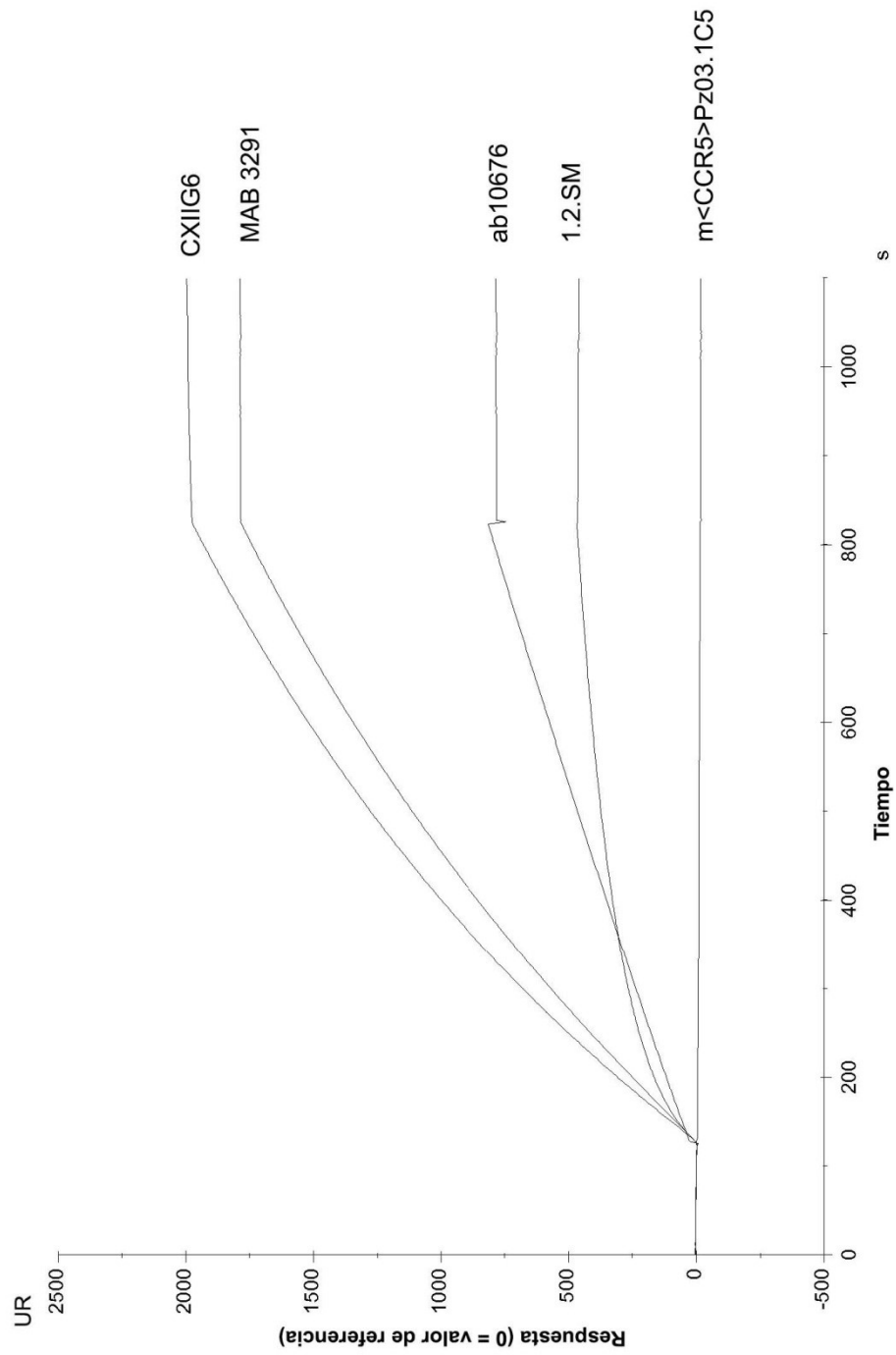


Fig. 2f

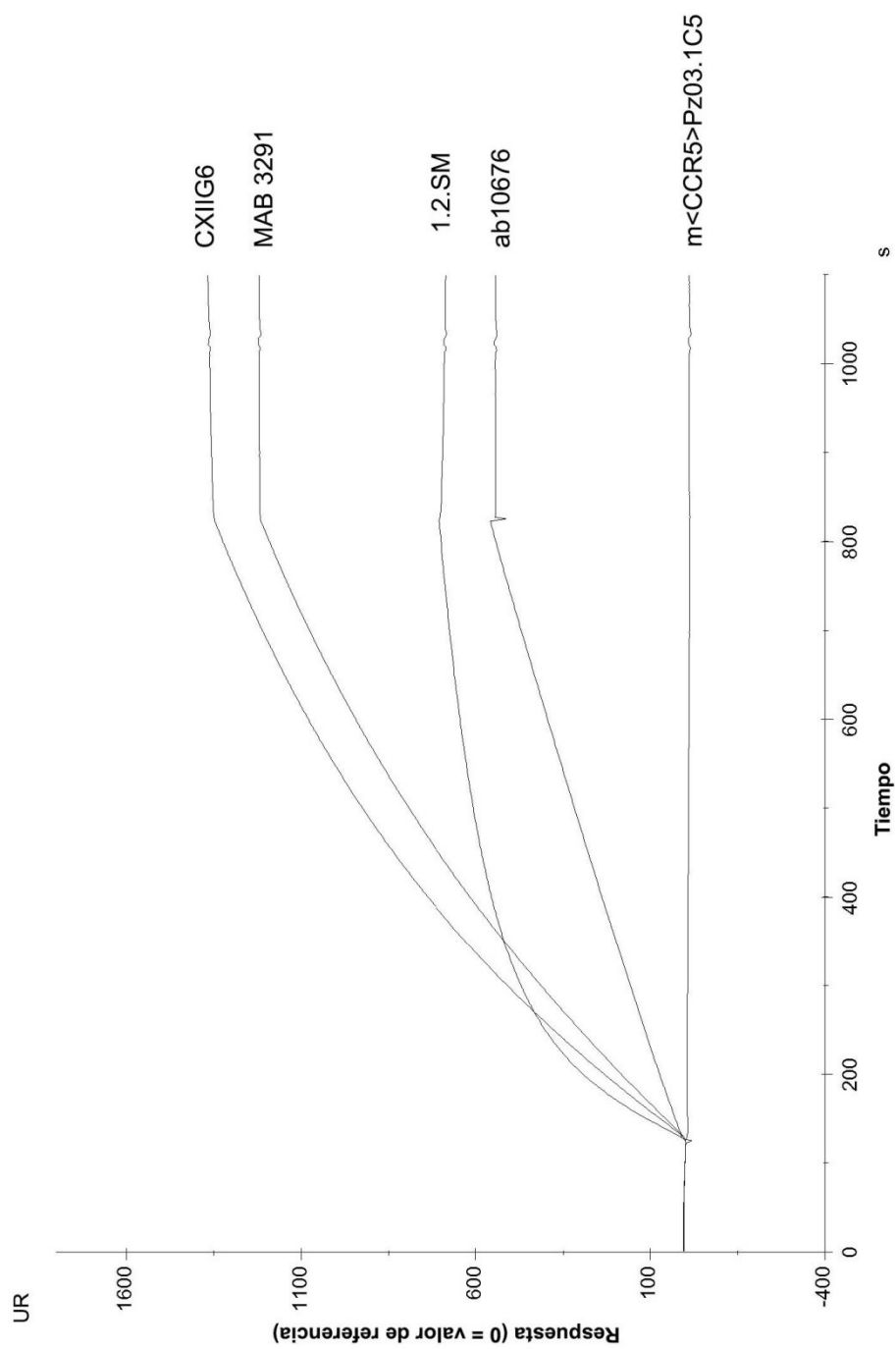


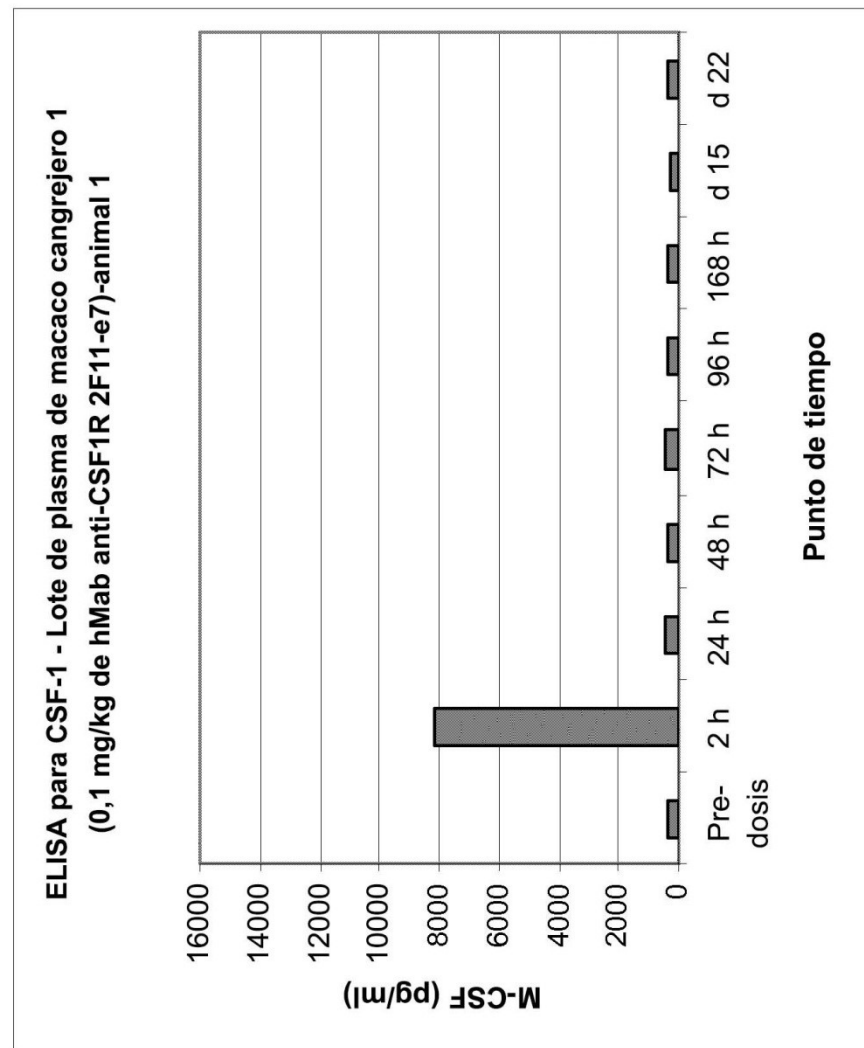
Fig. 3a

Fig. 3b

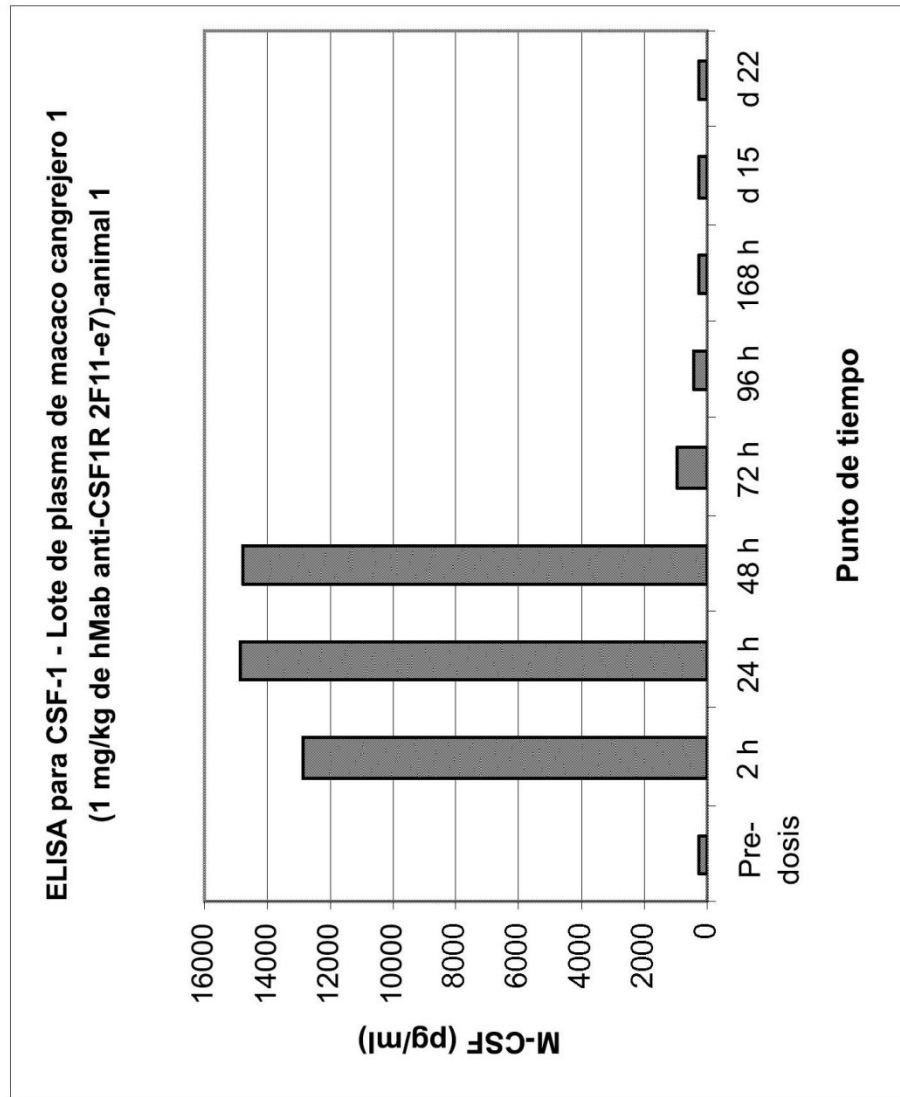


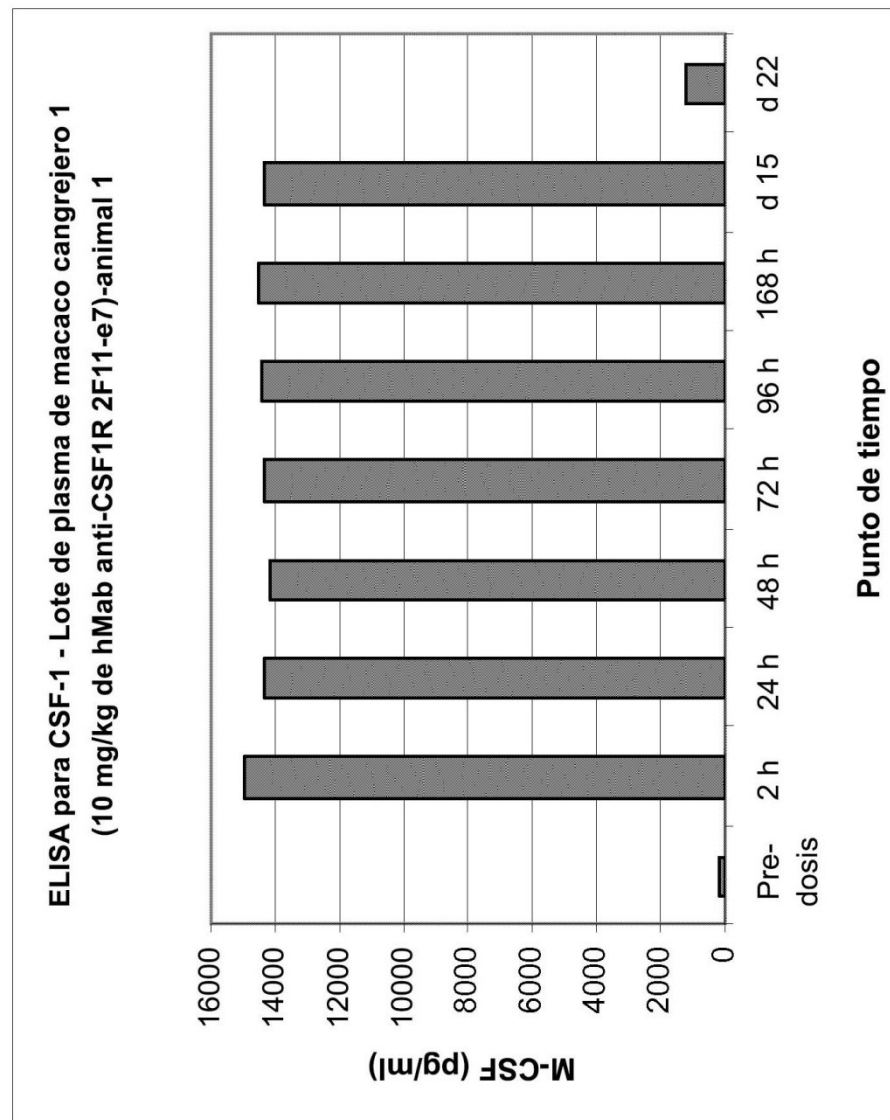
Fig. 3c

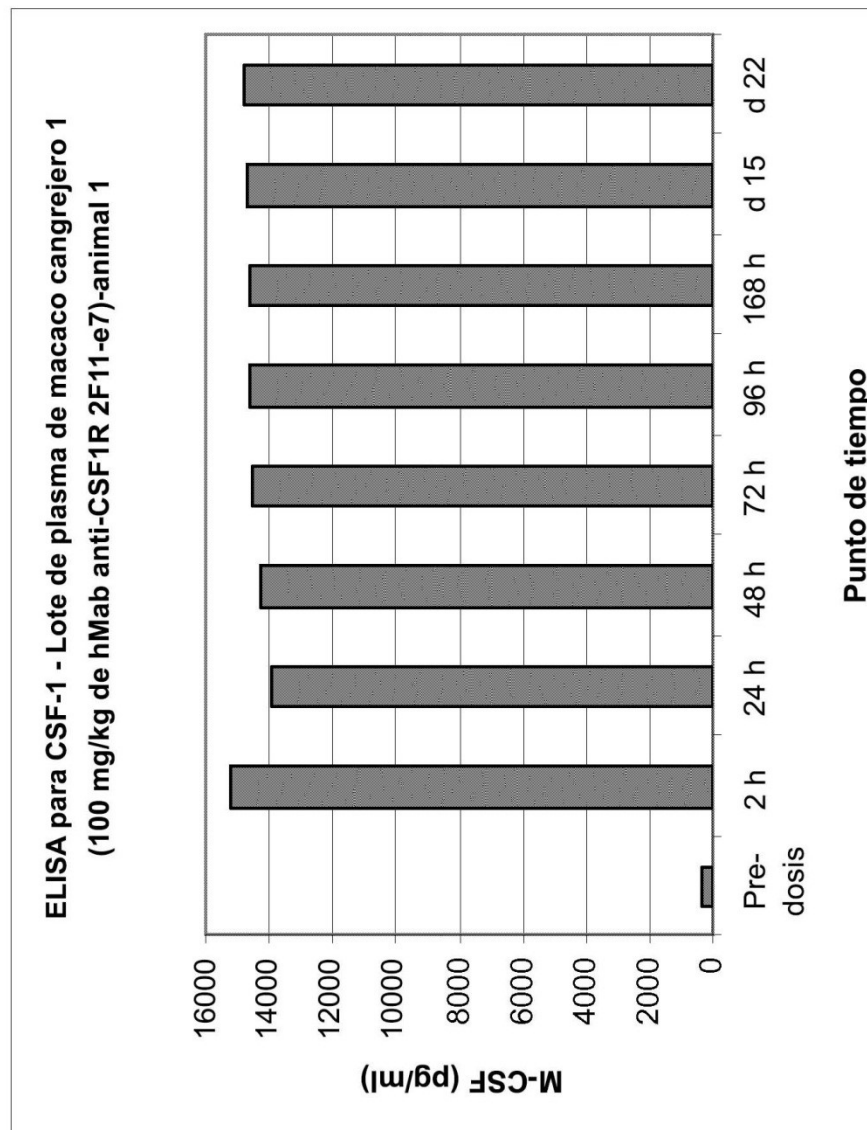
Fig. 3d

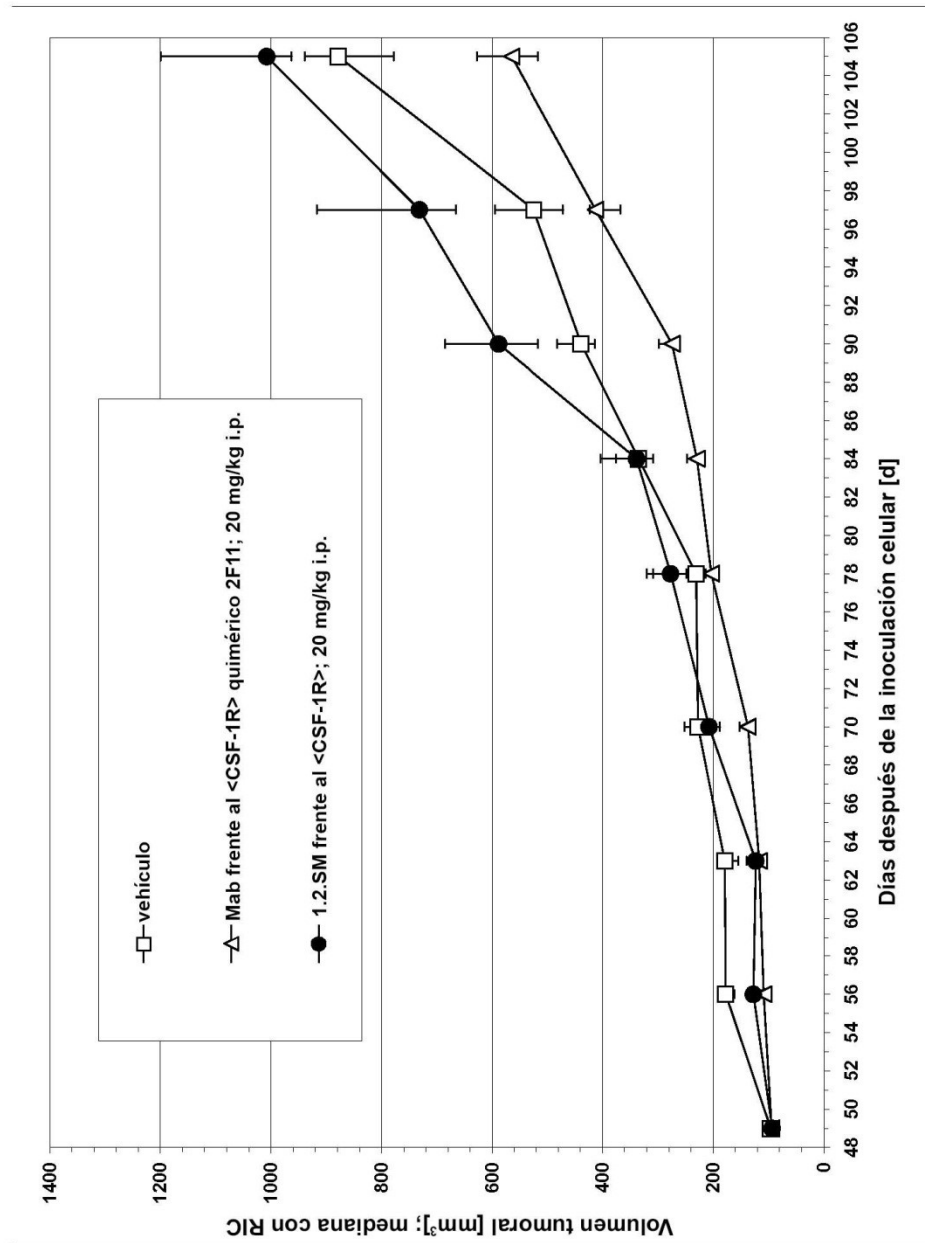
Fig. 4

Fig. 5a

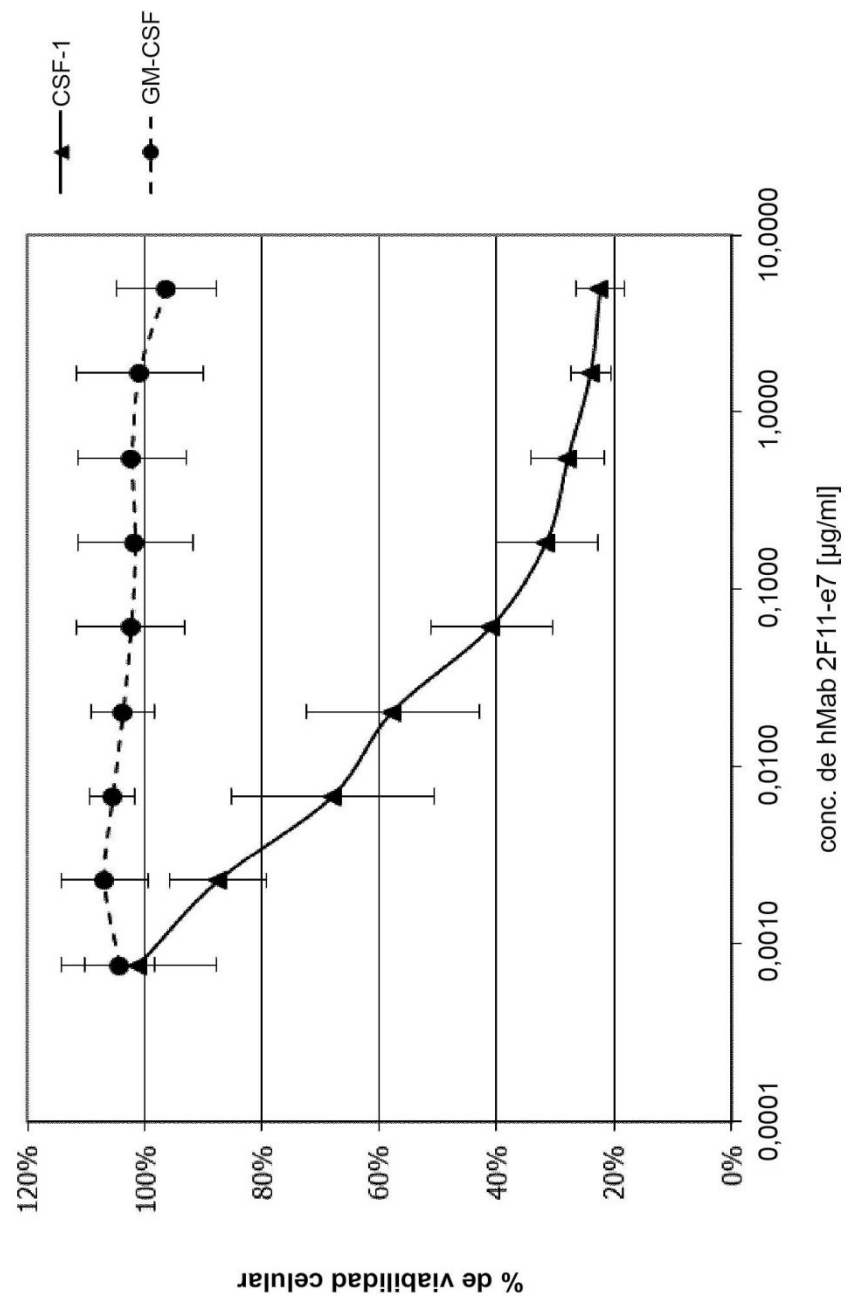


Fig. 5a

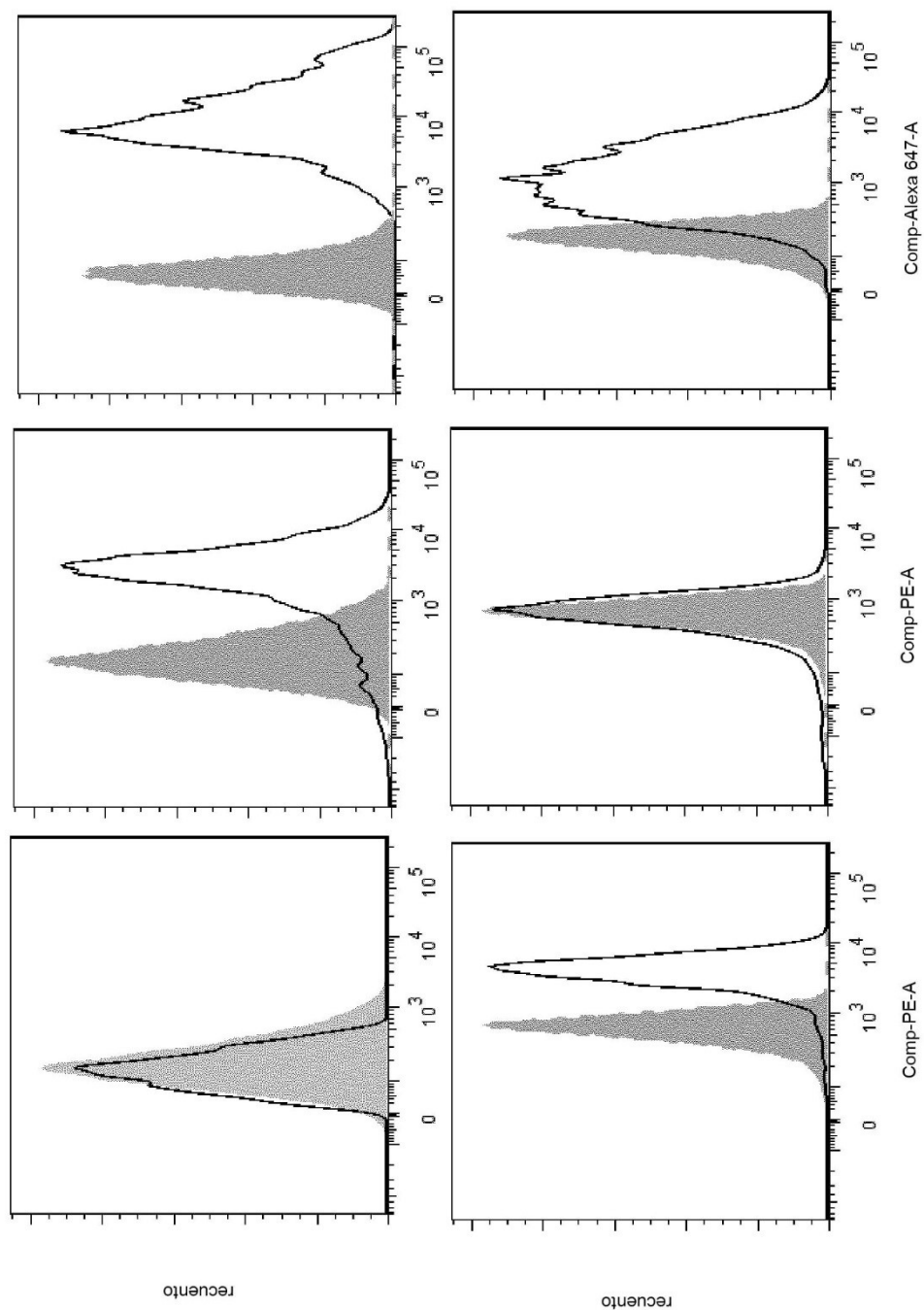


Fig. 6a

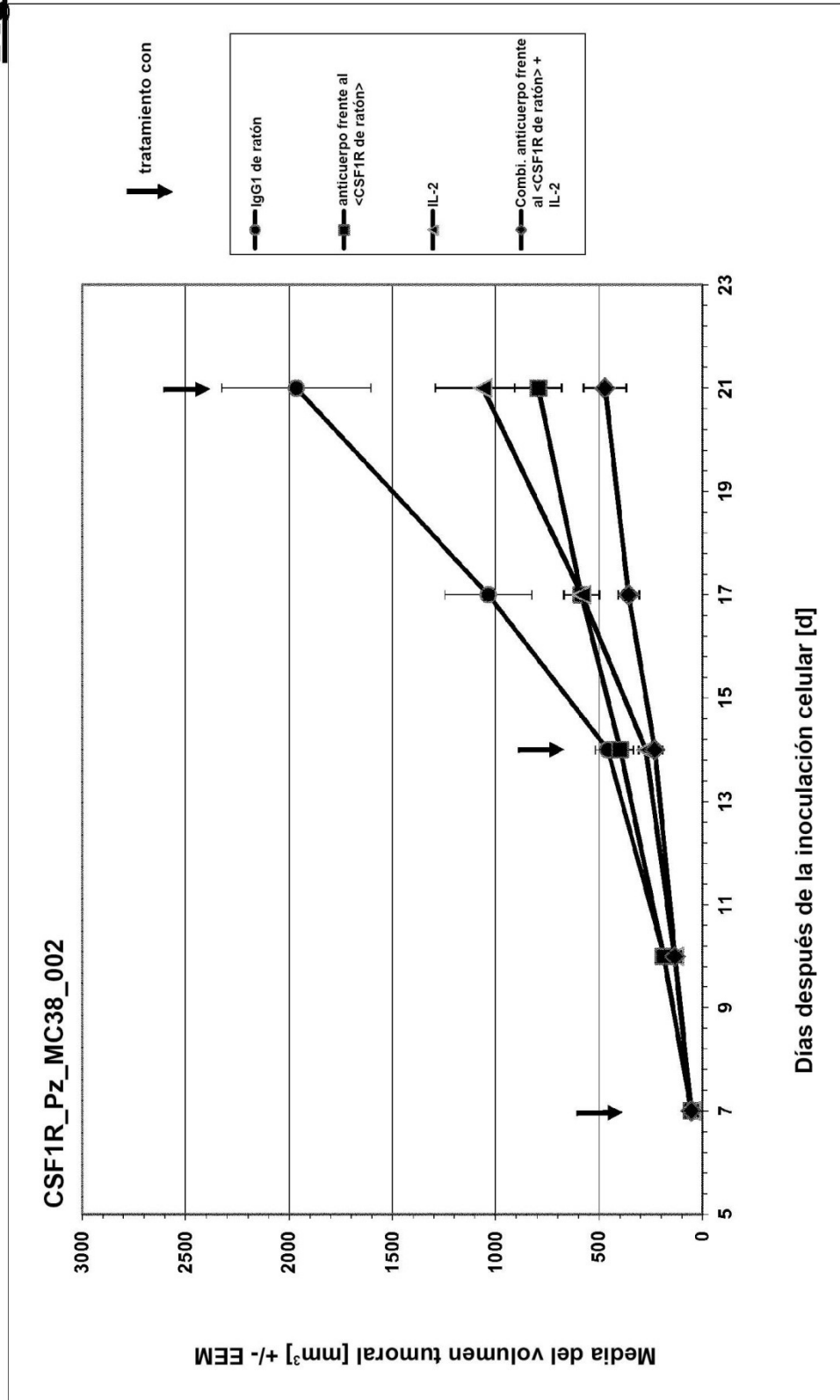


Fig. 6b

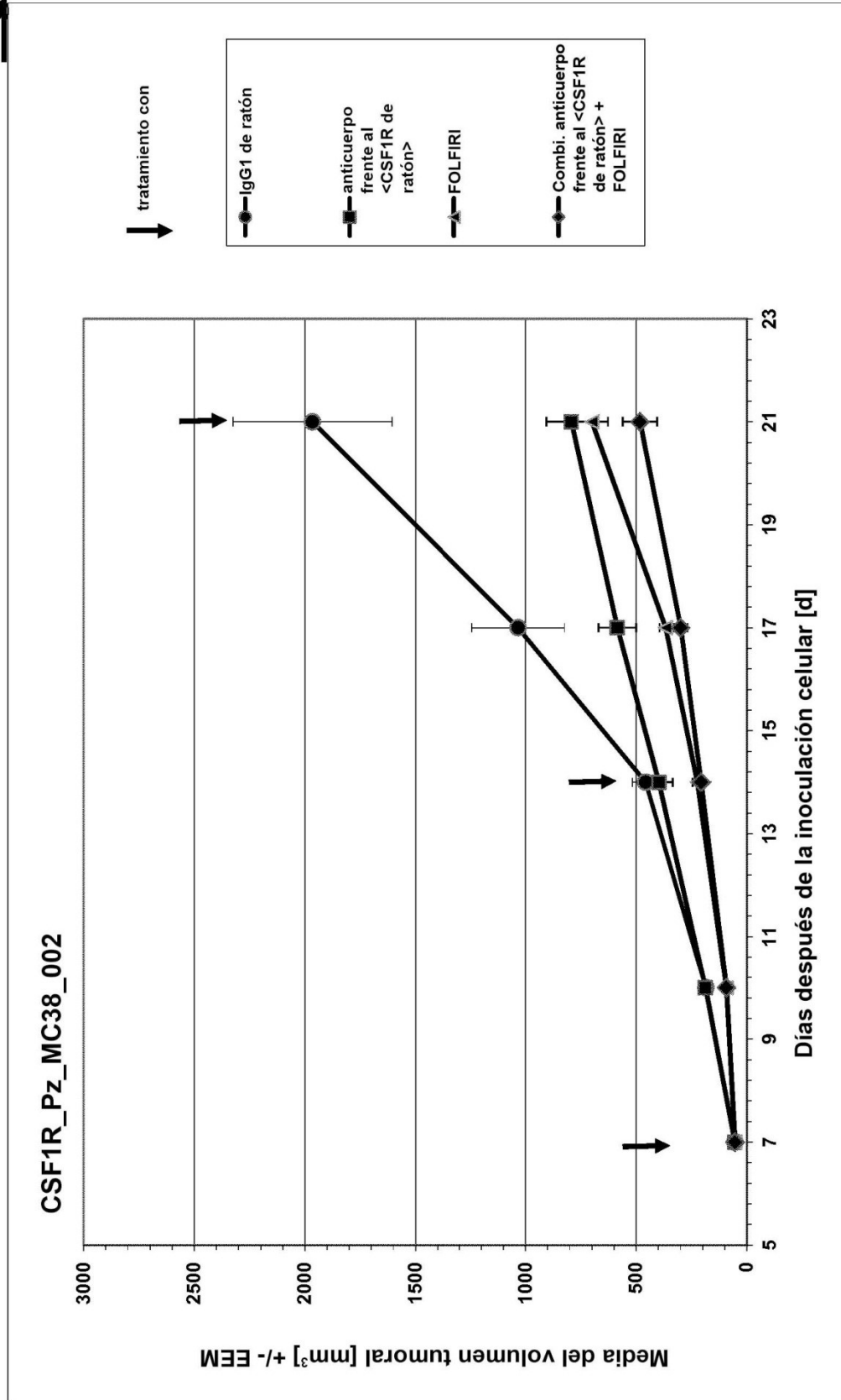


Fig. 6c

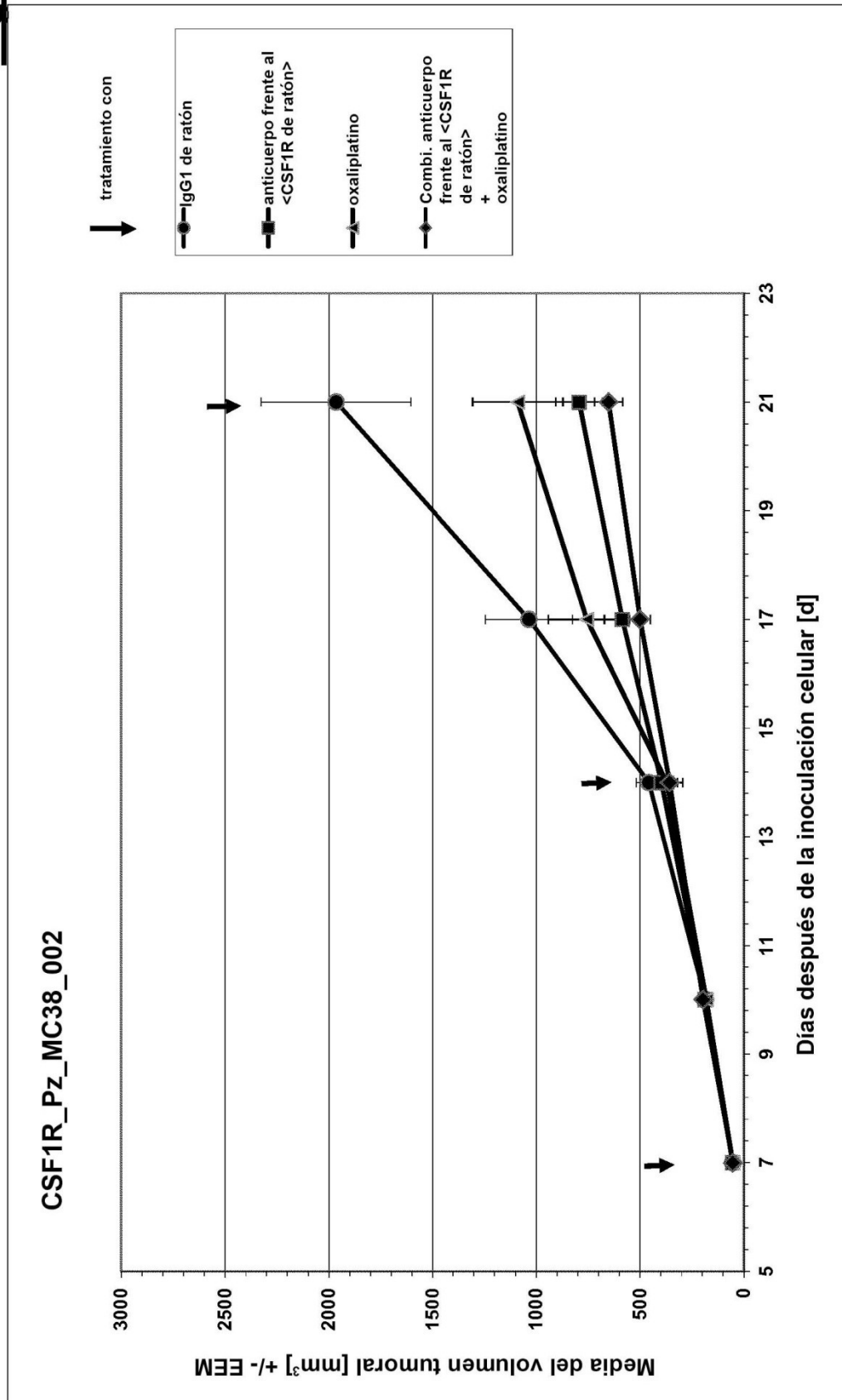


Fig. 7