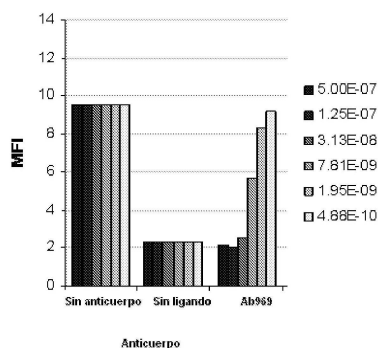


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

FIGURA 4



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS			
2	Datos del Solicitante		
Nombre:		UCB BIOPHARMA SPRL	Dirección Electrónica:
			clientes@cavelier.com
Dirección:		60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels, Bélgica	Domicilio/País de constitución:
			BELGICA - BRUSSEL - BRUSELAS
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT	
Número:		1021106-	
3	Solicitantes		

Apellidos - Nombres o Razón Social		Tipo	Identificación
1.	UCB BIOPHARMA SPRL	EE	1021106
4	Datos del Inventor		
Nombre:		Graham CRAGGS	Dirección Electrónica: clientes@cavelier.com
Dirección:		c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road Slough Berkshire SL1 3WE, Reino Unido de la Gran Bretaña	Domicilio/País de constitución: REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA - INGLATERRA - BERKSHIRE
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA	
☐ EMPRESA EXTRANJERA		☐ NIT	
☐ PASAPORTE		☒ No Aplica	
Número:		-	
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1.	CRAGGS Graham	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	
2.	HERVÉ Karine Jeannine Madeleine	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	
3.	MARSHALL Diane	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	
6	Datos Inventor(es)		
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad Dirección

1.	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	INGLATERRA	BERKSHIRE	c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road Slough Berkshire SL1 3WE, Reino Unido de la Gran Bretaña
2.	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	INGLATERRA	BERKSHIRE	c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road Slough Berkshire SL1 3WE, Reino Unido de la Gran Bretaña
3.	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	INGLATERRA	BERKSHIRE	c/o IPD UCB Celltech 208 Bath Road Slough Berkshire SL1 3WE, Reino Unido de la Gran Bretaña

7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:		JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI	Dirección Electrónica: cavelier@cavelier.com
Dirección:		CARRERA. 4 No. 72- 35	Domicilio/País de constitución: COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE Número: 79780910-		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT	

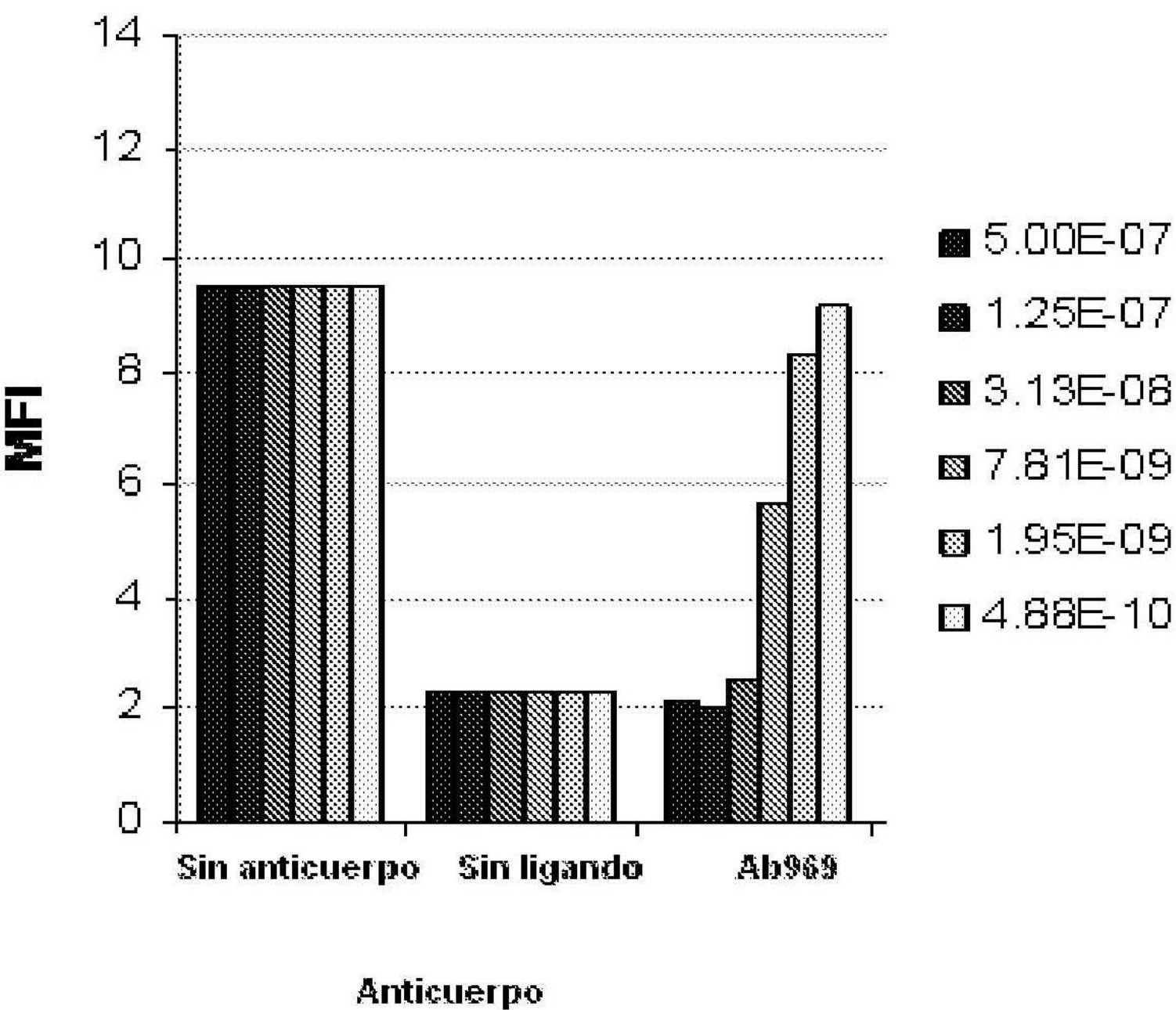
Presentación de Poder			
Año de Radicación			
Número de Radicación			

8	Datos Solicitud: PCT / WO		
Número Solicitud:		PCT/EP2014/068050	Fecha Solicitud: 26/08/2014
Número Publicacion:		WO 2015/028455 A1	Fecha Publicacion: 05/03/2015

9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO
---	-----------------------------------	--

1.	(33) País de origen REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	Codigo del país GB	(31) No. Solicitud 1315487.7	(32) Fecha 30/08/2013
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		34	Pago Reivindicaciones:	No
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☐ Otros Anexos				

FIGURA 4



ANTICUERPOS

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CSF-1R y fragmentos de unión del mismo, ADN que codifica el mismo, células huésped que comprenden dicho ADN y métodos de expresar el anticuerpo o fragmento de unión en una célula huésped. La invención además se extiende a composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo o un fragmento de unión del mismo y el uso del anticuerpo, fragmento de unión y composiciones que comprenden el mismo en tratamiento.

El factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), también conocido como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es una citoquina producida por una variedad de células, incluyendo macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. El CSF-1 se compone de dos polipéptidos “monómero”, que forman una proteína biológicamente activa dimerica de CSF-1. El CSF-1 existe en al menos tres formas maduras debido al corte o empalme de ARN alternativo (véase, Cerretti *et al.*, 1988, Molecular Immunology, 25:761). Las tres formas de CSF-1 se traducen a partir de diferentes precursores de ARNr, los cuales codifican monómeros de polipéptido de 256 a 554 aminoácidos, que tienen una secuencia de serial de 32 aminoácidos en el extremo amino y una región de transmembrana putativa de aproximadamente 23 aminoácidos cerca del extremo carboxilo. Los péptidos precursores son procesados posteriormente por escisiones proteolíticas de terminal amino y terminal carboxilo para liberar CSF-1 maduro. Los residuos 1-149 de todas las tres formas maduras de CSF-1 son idénticos y se cree que contienen secuencias esenciales para la actividad biológica de CSF-1. Los monómeros CSF-1 *en vivo* están glicosilados y dimerizados a través de enlace-disulfuro. El CSF-1 pertenece a un grupo de agonistas biológicos que promueven la producción de células sanguíneas. Específicamente, actúa como un factor de crecimiento y diferenciación para células progenitoras de médula ósea del linaje fagocítico mononuclear. Además, el CSF-1 estimula la supervivencia, proliferación y función de los macrófagos a través de un receptor específico en células que responden.

El receptor CSF-1 (CSF-1R) también se denomina el producto de gen c-fms o CD115. El CSF-1R es una glicoproteína TM 165kDa tipo 1 que pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa tipo III. Además del CSF-1, la molécula estructuralmente similar pero no relacionada en cuanto a la secuencia IL-34 también ha demostrado ser un ligando para CSF-1R (Lin, *et al.*, 2008, Science 320:807-811). La expresión de CSF-1R está restringida a las células del linaje macrófago-monocito, a poblaciones de tejido tanto circulante como residente, y a los

osteoclastos. Además, se expresa en un número de células del sistema reproductor femenino que incluye oocitos, células deciduales y trofoblastos.

La unión del ligando de CSF-1 al receptor de CSF-1 resulta en la fosforilación del receptor en uno o más residuos de tirosina, mediante la acción del dominio de quinasa de tirosina. Esta fosforilación se puede detectar porque los anticuerpos están disponibles, los cuales se unen al receptor sólo después de la fosforilación (por ejemplo, Receptor-CSF-M-fosfo (Tyr546) anticuerpo # 3083 de Cell Signaling Technology).

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

Los anticuerpos a CSF-1R son conocidos en el arte. Sherr, C.J. *et al.*, 1989, Blood 73:1786-1793, describe anticuerpos contra CSF-1R que inhiben la actividad de CSF-1 (Sherr, C.J. *et al.*, 1989, Blood 73:1786-1793). WO2009/026303 da a conocer anticuerpos anti-CSF-1R que se unen a modelos tumorales de ratón *in vivo* y CSF-1R humano que usan un anticuerpo CSF-1R anti-murino. WO2011/123381 da a conocer anticuerpos anti-CSF-1R que internalizan CSF-1R y tienen actividad ADCC. WO2011/123381 también da a conocer modelos tumorales de ratón *in vivo* que usan anticuerpos CSF-1R anti-murino. WO2011/140249 da a conocer anticuerpos anti-CSF-1R que bloquean la unión de CSF-1 a CSF-1R y que se consideran útiles en el tratamiento del cáncer. WO2009/112245 da a conocer un anticuerpo anti-CSF-1R IgG1 que impide que CSF-1 se una a CSF-1R y del cual se afirma resulta útil en el tratamiento de cáncer, enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide. WO2011/131407 da a conocer un anticuerpo anti-CSF-1R que impide que CSF-1 se una a CSF-1R y del cual se afirma resulta útil en el tratamiento de pérdida ósea y cáncer. WO2011/107553 se describe un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la unión de CSF-1 a CSF-1R y que según se cree resulta útil en el tratamiento de pérdida ósea y cáncer. WO2011/070024 se describen anticuerpos anti-CSF-1R que se unen al fragmento de CSF-1R humano delD4.

Hay una necesidad en el arte de proporcionar nuevos anticuerpos anti-CSF-1R adecuados para aplicaciones terapéuticas. Aunque se describió anteriormente la aplicación terapéutica de anticuerpos anti-CSF-1R en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, todavía hay una necesidad de proporcionar nuevas aplicaciones terapéuticas para tales anticuerpos.

El término “enfermedad fibrótica” se refiere a una respuesta anormal de cicatrización en donde se forma un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. La deposición y acumulación excesiva de componentes de matriz extracelular, tal como el colágeno y la fibronectina, resulta en el endurecimiento y cicatrización de tejidos que en última instancia puede conducir a la insuficiencia de órganos.

Ejemplos de enfermedades fibróticas incluyen fibrosis pulmonar, por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística, fibrosis renal, fibrosis hepática, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, infarto de miocardio, esclerosis sistémica, esclerodermia y artrofibrosis.

Las heridas resultan en una coagulación inmediata y respuesta de coagulación, junto con el desarrollo de una matriz extracelular provisoria (ECM). La agregación y activación plaquetaria ayuda a promover una respuesta inflamatoria caracterizada por la vasodilatación y un aumento de permeabilidad de vasos sanguíneos permitiendo la captación de una variedad de células inmunes que incluyen neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos. Los neutrófilos y macrófagos desbridan la herida reduciendo así el riesgo de infección y, junto con los linfocitos activados, secretan una variedad de factores de crecimiento y citoquinas que sirven para amplificar adicionalmente la respuesta inflamatoria. Las moléculas tales como TGF β , PDGF, IL-13 activan macrófagos y conducen a la captación, proliferación y activación de fibroblastos en el sitio de la herida. Los fibroblastos o miofibroblastos activados se caracterizan por la expresión de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) y segregan colágeno y otros componentes ECM. Los fibroblastos activados contraen la red de colágeno, llevando los bordes de la herida hacia el centro. Las células epiteliales y endoteliales proliferan y migran a través de la matriz temporal para regenerar el tejido dañado, completando la curación de la herida.

El abuso o daño constante del tejido, o una desregulación de la vía de reparación, lleva a una respuesta inadecuada de la herida. Se produce un exceso de deposición y el hiper-entrecruzamiento del colágeno y ECM, lo que lleva a una formación excesiva y endurecimiento del tejido de la cicatriz, en lugar de la arquitectura normal del tejido.

La causa de la enfermedad fibrótica puede depender del órgano o tejido implicado y se desconoce en algunas enfermedades tales como la fibrosis pulmonar idiopática (IPF). La fibrosis

hepática, y en última instancia la cirrosis, son consecuencia del daño hepático crónico sufrido debido a la exposición a una variedad de factores, incluyendo factores ambientales y relacionados con la dieta, o agentes infecciosos. Las infecciones a largo plazo por hepatitis B y C pueden causar fibrosis hepática. El consumo excesivo de alcohol en forma sostenida, o una dieta alta en grasas/azúcar también pueden provocar cirrosis hepática. Del mismo modo, la diabetes puede dañar y dejar cicatrices en los riñones, lo que lleva a una pérdida funcional.

La IPF es una de las siete enfermedades pulmonares intersticiales cuya causa se desconoce. Factores ambientales tales como la exposición a radiación o partículas pueden estar asociados. Las personas que fuman también se encuentran en mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad. Una vez diagnosticada, el tiempo de vida de los pacientes es muy corto, siendo la tasa de supervivencia promedio de 2-5 años.

El tratamiento de la enfermedad fibrótica incluye normalmente agentes inmunosupresores y antiinflamatorios, pero estos son de poco beneficio para el paciente. La falta de eficacia de estos tratamientos ha contribuido a la reconsideración de IPF y enfermedad fibrótica en general, como una respuesta anormal a la cicatrización y no a una condición inflamatoria. La pirfenidona es un fármaco de molécula pequeña que se aprobó en Japón en 2008 y en Europa en 2011 para su uso en el tratamiento de IPF, el cual se supone puede funcionar a través de múltiples mecanismos de acción. A la fecha, no se ha aprobado ninguna terapia específica y ninguna terapia de anticuerpos para indicaciones fibróticas.

Por lo tanto, en la actualidad existe una necesidad médica no cubierta de mejorar el tratamiento de la enfermedad fibrótica. Por ejemplo, para la FPI hay una tasa de supervivencia de 3 años del 50% y una tasa de supervivencia de 5 años de solo 20%, necesitándose un trasplante en alrededor del 20% de los casos.

Resumen de la descripción

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

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

Los anticuerpos de la descripción tienen una gran afinidad por CSF-1R, son capaces de bloquear la unión del ligando a CSF-1R, son no activadores para CSF-1R y no generan internalización de CSF-1R.

La descripción también abarca un polinucleótido, tal como ADN, que codifica un anticuerpo o fragmento tal como se describe en el presente documento.

También se proporciona una célula huésped que comprende dicho polinucleótido.

En el presente documento se proporcionan métodos para expresar un anticuerpo o fragmento de unión del mismo.

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

En una forma de realización, se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, fragmento o composición tal como se describe en el presente documento.

La presente descripción también abarca un anticuerpo, fragmento de unión o composición de acuerdo a la presente descripción para su uso en un tratamiento, en especial en el tratamiento del cáncer y/o enfermedad fibrótica.

Detalles de la descripción

En una forma de realización, los anticuerpos proporcionados por la presente invención son capaces de bloquear la unión del ligando a CSF-1R. El bloqueo, tal se emplea en el presente documento, hace referencia a un bloqueo físico, como por ejemplo la oclusión del receptor, pero también incluye el caso en el que el anticuerpo o los fragmentos se unen a un epítipo que provoca, por ejemplo, un cambio conformacional que implica que el ligando natural al receptor ya no se une (lo cual se denomina en este documento bloqueo alostérico o inhibición alostérica). En una forma de realización, los anticuerpos de la presente descripción unen todos los isotipos de

CSF-1R, por ejemplo, aquellos con variaciones en el dominio ECD, tales como V23G, A245S, H247P, V279M y combinaciones de dos, tres o cuatro de dichas variaciones.

Los ensayos adecuados para determinar la capacidad de un anticuerpo para bloquear CSF-1R se describen en los Ejemplos de este documento. CSF-1 y IL-34 son ligandos para CSF-1R, y los anticuerpos de la invención inhiben preferiblemente la actividad tanto de CSF-1 como de IL-34 en una pantalla celular funcional. Los anticuerpos de acuerdo a la presente invención preferiblemente no causan tampoco activación CSF-1R y/o internalización CSF-1R. Los anticuerpos de acuerdo a la presente invención también reducen de forma selectiva y preferente la población no clásica de monocitos *in vivo*.

Los monocitos no clásicos se refieren en general a monocitos con baja expresión de CD14 y alta expresión de CD16. Esta población de monocitos se cree que son precursores de macrófagos asociados a tumores.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una alta afinidad de unión. La afinidad puede medirse usando cualquier método adecuado conocido en el arte, incluyendo técnicas tales como resonancia de plasmón superficial, por ejemplo BIAcore, tal como se describe en los Ejemplos de este documento, usando CSF-1R aislado recombinante o natural o una proteína/polipéptido de fusión adecuada. En un ejemplo, la afinidad se mide usando dominio extracelular de CSF-1R humano recombinante tal como se describe en los Ejemplos de este documento. En un ejemplo, el dominio extracelular de CSF-1R humano recombinante que se usa es un monómero. Adecuadamente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen una afinidad de unión para CSF-1R humano aislado de aproximadamente 1nM o inferior a 1nM. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 500 pM o inferior. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 250 pM o inferior. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 200pM o inferior. En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R con una afinidad de unión de aproximadamente 100pM o inferior. En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R humanizado con una afinidad de unión de aproximadamente 100pM o inferior, preferiblemente de aproximadamente 10pM o inferior, más preferiblemente de aproximadamente 5pM o inferior. En otra forma de

realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R humanizado con una afinidad de unión de aproximadamente 100pM o inferior, preferiblemente de aproximadamente 10pM o inferior, más preferiblemente de aproximadamente 5pM o inferior.

Cuanto menor sea el valor numérico de la afinidad, más alta es la afinidad del anticuerpo o fragmento para el antígeno.

El CSF-1R humano, tal como se emplea aquí, se refiere a la proteína humana denominada CSF-1R o un fragmento biológico activo de la misma, por ejemplo tal como se da en SEQ ID NO: 39 o se registra en UniProt bajo el número P07333. Claro está, la proteína madura expresada no comprende la secuencia de serial porque este último se escinde después de la traducción.

Los presentes inventores han proporcionado nuevos anticuerpos anti-CSF-1R, incluyendo anticuerpos humanizados. Los anticuerpos se generaron a partir de la inmunización de ratas con fibroblastos de rata que fueron transfectados con un vector que expresa dominio extracelular de CSF-1R. La detección primaria de sobrenadantes para unión del anticuerpo a CSF-1R humano permitió identificar aproximadamente 1000 pocillos que contienen anticuerpos con actividad anti-CSF-1R. La detección secundaria de anticuerpos capaces de impedir la unión de CSF-1 humano a CSF-1R humano permitió identificar 88 pocillos positivos. La detección terciaria de anticuerpos capaces de impedir la supervivencia dependiente de CSF-1 de los monocitos humanos primarios permitió identificar 18 pocillos positivos. Se clonaron las regiones variables de estos 18 pocillos positivos, lo que llevó a la clonación exitosa de 14 anticuerpos, y la posterior expresión que proporcionó 9 anticuerpos quiméricos anti-CSF-1R que se expresaron a niveles suficientes y fueron capaces de inhibir la unión de CSF-1. Estos 9 anticuerpos fueron secuenciados y se determinó que todos tienen secuencias únicas; los mismos fueron utilizados para su estudio adicional.

Los 9 anticuerpos quiméricos anti-CSF-1R se evaluaron para determinar la actividad de bloqueo de ligandos y la capacidad de inhibir la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 e IL-34. Cuatro de los anticuerpos fueron priorizados para una investigación adicional dado que demostraron una inhibición completa de la unión de CSF-1, así como altos niveles de inhibición de la supervivencia de los monocitos. Estos 4 anticuerpos quiméricos anti-CSF-1R fueron ensayados para determinar su actividad en una serie de ensayos *in vitro* para evaluar la afinidad, la inhibición de la unión de CSF-1, la reactividad cruzada con mono *rhesus*, mono *cynomolgus* y

CSF-1R canino, internalización de CSF-1R y activación de CSF-1R. Los cuatro anticuerpos anti-CSF-1R también se humanizaron y se midió la afinidad de los injertos humanizados. La humanización de dos de los anticuerpos anti-CSF-1R generó anticuerpos totalmente humanizados (sin residuos de donantes rata presentes) con una afinidad (K_D) equivalente a la del anticuerpo quimérico parental y una T_m que indica que el anticuerpo posee una estabilidad térmica adecuada. En contraste, los otros dos anticuerpos anti-CSF-1R humanizados tenían una afinidad reducida para CSF-1R, en relación con el anticuerpo quimérico, y la T_m fue menor. Por estas razones, solo los injertos totalmente humanizados de dos de los anticuerpos que conservaron afinidad se expresaron en mayor escala para un análisis adicional.

Se llevó a cabo el análisis adicional de los injertos completamente humanizados de estos dos anticuerpos y una prueba de inhibición MCP-1, donde la inhibición de señalización CSF-1R, mediante el anticuerpo que bloquea unión de CSF-1, causó una reducción en los niveles de secreción de MCP-1. Este ensayo reveló sorprendentemente que los injertos totalmente humanizados mostraron actividad reducida en comparación con el anticuerpo quimérico. Se llevó a cabo una serie de experimentos en uno de los anticuerpos preferidos, denominado Ab969, para revelar por qué el injerto completamente humanizado exhibió esta actividad reducida. Se generó un número de injertos humanizados intermedios de Ab969 y se probaron en el ensayo de inhibición de MCP-1. Se encontró que los injertos que contenían el residuo de donante Y71 de la cadena ligera variable generalmente mostraban actividad en el ensayo de inhibición de MCP-1 comparable a la del Ab969 quimérico. Se formuló la hipótesis de que esta diferencia en la actividad de los diversos injertos de anticuerpos en el ensayo de inhibición de MCP-1 fue debido a un cambio en la constante de asociación del anticuerpo (disminución de K_a) en comparación con el Ab969 quimérico.

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

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

Por consiguiente, se seleccionó un injerto de anticuerpo de Ab969, Ab969.g2 (también denominado Ab969) para estudios adicionales de caracterización *in vitro*. Además de la alta

afinidad de unión ventajosa a CSF-1R, la alta estabilidad térmica y la alta estabilidad física, el anticuerpo demostró buena inhibición de la activación de monocitos dependiente de IL-34, y también se determinó que era capaz de unirse a las variantes SNP de CSF-1R. El Ab969.g2 también se utilizó para el análisis de marcadores farmacodinámicos en un mono *cynomolgus*, donde se demostró que se unía a CSF-1R, bloqueaba la unión de CSF-1 y agotaba selectivamente la población no clásica de monocitos de mono *cynomolgus in vivo*, los cuales constituyen células precursoras de macrófagos asociados a tumores.

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

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

Los residuos en los dominios variables de anticuerpos se numeran convencionalmente según un sistema ideado por Kabat *et al.*, 1987. Este sistema se describe en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., NIH, EE.UU. (en lo sucesivo “Kabat *et al. (supra)*”). Este sistema de numeración se usa en la presente descripción salvo que se indique lo contrario.

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

Las CDR del dominio variable de cadena pesada se encuentran en los residuos 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, de acuerdo con Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 hasta el residuo 32. Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, la expresión ‘CDR-H1’ tal como se emplea en el presente documento, pretende referirse a los residuos 26 a 35, tal como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y definición de bucle topológico de Chothia.

Las CDR del dominio variable de cadena ligera se encuentran en los residuos 24-34 (CDR-L1), residuos 50-56 (CDR-L2) y residuos 89-97 (CDR-L3) de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Los anticuerpos para uso en la presente descripción pueden obtenerse empleando cualquier método adecuado conocido en el arte. Se puede utilizar la proteína/polipéptido de CSF-1R que incluye proteínas de fusión, células que expresan (de forma recombinante o natural) el polipéptido para producir anticuerpos que reconocen específicamente CSF-1R. El polipéptido puede ser el polipéptido ‘maduro’ o un fragmento biológicamente activo o derivado del mismo. La proteína humana se ha registrado en UniProt con el número P07333.

Los polipéptidos utilizados para inmunizar a un huésped se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en el arte a partir de células huésped manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión, o pueden recuperarse a partir de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término “polipéptidos” incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se utilizan de manera indistinta a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido de CSF-1R puede en algunos casos ser parte de una proteína mayor tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a una etiqueta de afinidad o similar.

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

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

Los anticuerpos también pueden generarse utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos únicos mediante clonación y expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos únicos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 93:7843-7848; WO92/02551; WO04/051268 y en la Solicitud de Patente Internacional número WO04/106377.

La detección de anticuerpos puede realizarse utilizando ensayos para medir la unión a CSF-1R humano y/o ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión del ligando al receptor. En los Ejemplos de este documento se describen ejemplos de ensayos adecuados.

El término “específico”, tal como se emplea en este documento, pretende referirse a un anticuerpo que sólo reconoce el antígeno para el que es específico, o a un anticuerpo que posee una afinidad significativamente mayor de unión al antígeno para el que es específico, en comparación con la unión a antígenos para los cuales es no específico, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de unión.

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

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

En un segundo aspecto de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable

de la cadena ligera comprende al menos uno de una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 1 para CDR L1, una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3. Preferiblemente, el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia incluida en SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia incluida en SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

En una forma de realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que comprende una cadena pesada tal como se define anteriormente, y que adicionalmente comprende una cadena ligera donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 1 para CDR L1, una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3. El dominio variable de la cadena ligera comprende preferiblemente la secuencia incluida en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, la secuencia incluida en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y la secuencia incluida en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3.

En una forma de realización, al menos un aminoácido es reemplazado por una sustitución conservadora en una o más CDR seleccionadas del grupo que consiste independientemente en:

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

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

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

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

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

En una forma de realización, un dominio de la cadena pesada descrita en este documento incluye la secuencia con 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos, por ejemplo, donde las sustituciones son en el marco.

En una forma de realización, el marco de la región variable de cadena pesada comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos que se han insertado, eliminado o sustituido, o una combinación de los mismos. En una forma de realización, el aminoácido sustituido es un aminoácido correspondiente del anticuerpo donante.

En una forma de realización, una región variable ligera descrita en este documento incluye la secuencia con 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadoras de aminoácidos, por ejemplo, donde las sustituciones son en el marco.

En una forma de realización, el marco de la región variable de cadena ligera comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos que se han insertado, eliminado o sustituido, o una combinación de los mismos. En una forma de realización, el aminoácido sustituido es un aminoácido correspondiente de un anticuerpo donante.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR y la secuencia de CDR-H1 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia incluida en la SEQ ID NO: 4, la secuencia de CDR-H2 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia incluida en SEQ ID NO: 5 y la secuencia de CDR-H-3 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia incluida en la SEQ ID NO: 6. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo, que comprende, además, una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR y la secuencia de CDR-L1 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia incluida en la SEQ ID NO: 1, la secuencia de CDR-L2 tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con la secuencia incluida en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de CDR-L3 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia incluida en la SEQ ID NO: 3.

En una forma de realización, una región variable posee al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de identidad o similitud con una secuencia de región variable descrita en este documento. En otra forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R que compite con la unión de un anticuerpo o fragmento de la invención para la unión al receptor de CSF-1R,

preferentemente el dominio extracelular del receptor de CSF-1R, más específicamente al receptor de CSF-1R de las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38 y/o 39 o la secuencia en la entrada P07333 de la base de datos UniProt, en particular, al dominio extracelular del receptor de CSF-1R de la SEQ ID NO: 36 o los 498 aminoácidos del dominio extracelular descrito en la entrada P07333 de la base de datos UniProt (aminoácidos 20 a 517 de P07333).

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

En otra forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que inhibe o se superpone con la unión de CSF-1 y/o IL-34 al dominio extracelular del receptor CSF-1R.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R que bloquea en forma cruzada la unión de un anticuerpo que comprende las 6 CDR incluidas en la secuencia SEQ ID NO:1 para CDR-L1, SEQ ID NO:2 para CDR-L2, SEQ ID NO:3 para CDR-L3, SEQ ID NO:4 para CDR-H1, SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y SEQ ID NO:6 para CDR-H3, por ejemplo con una afinidad de 100 pM o menos, en particular, donde el anticuerpo bloquea en forma cruzada la unión uniéndose al mismo epítipo que el anticuerpo al cual bloquea.

En una forma de realización, se proporciona el anticuerpo o fragmento de unión del mismo en el que un residuo C-terminal de la secuencia del anticuerpo se escinde, por ejemplo, el residuo C-terminal de una secuencia de cadena pesada, por ejemplo, una lisina terminal. En una forma de realización, el aminoácido se escinde de una secuencia descrita en este documento. Generalmente, la escisión resulta de las modificaciones post-traducción del anticuerpo o fragmento de unión expresado.

En otra forma de realización, se proporciona el anticuerpo anti-CSF-1R de cualquiera de las formas de realización descritas arriba o abajo donde la lisina C-terminal de la secuencia de cadena pesada incluida en SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 29 falta o se elimina. La falta o eliminación de la lisina C-terminal, por ejemplo, posición 453 de SEQ ID NO: 27 o posición 472 de la SEQ ID NO: 30 se puede lograr, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo anti-CSF-1R en un sistema de expresión sin la codificación de la lisina terminal. Alternativamente, la

delección de un residuo C-terminal, tal como lisina, puede efectuarse como una modificación post-traducción.

En una forma de realización se humanizan el anticuerpo o los fragmentos de unión de acuerdo con la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a una molécula de anticuerpo o anticuerpo donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal murino) injertada en un marco de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano) (ver, por ejemplo, US 5,585,089; WO91/09967). Para una revisión, véase Vaughan *et al*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una forma de realización, en lugar de transferirse toda la CDR, solo uno o más de los residuos determinantes de especificidad de cualquiera de las CDR descritas anteriormente en este documento son transferidos al marco de anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36:25-34). En una forma de realización, sólo los residuos determinantes de especificidad de una o más de las CDR descritas anteriormente en este documento se transfieren al marco de anticuerpo humano. En otra forma de realización, sólo los residuos determinantes de especificidad de cada una de las CDR descritas anteriormente en este documento se transfieren al marco de anticuerpo humano. Cuando se injertan las CDR o residuos determinantes de especificidad, puede utilizarse cualquier secuencia marco de región variable aceptora apropiada, teniendo en cuenta la clase/el tipo de anticuerpo donante del que se derivan las CDR, incluyendo regiones marco de ratón, de primates y de humanos.

Adecuadamente, el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene un dominio variable que comprende las regiones marco aceptoras de humano, así como una o más de las CDR proporcionadas específicamente en este documento. Por lo tanto, en una forma de realización se proporciona un anticuerpo humanizado que se une al CSF-1R humano donde el dominio variable comprende regiones marco aceptoras humanas y CDR de donante no humano.

Ejemplos de marcos humanos que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente,

se pueden usar secuencias de la línea germinal humana; estas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las cadenas pesadas y ligeras aceptoras no tienen necesariamente que derivar del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden incluir cadenas compuestas que tienen regiones marco derivadas de diferentes cadenas.

En una forma de realización, un marco humano comprende 1, 2, 3, o 4 sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 sustituciones conservadoras o sustituciones de residuos de donante.

En una forma de realización, la secuencia empleada como marco humano es en un 80%, 85%, 90%, 95% o más, similar o idéntica a una secuencia descrita en este documento.

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

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

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

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

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

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

En un anticuerpo humanizado de la presente invención, las regiones marco no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, los residuos inusuales pueden cambiarse a residuos que se producen con más frecuencia para dicha clase o tipo de cadena aceptora. Alternativamente, los residuos seleccionados en las regiones marco aceptoras se pueden cambiar de manera que correspondan al residuo encontrado en la misma posición en el anticuerpo donante (véase Reichmann *et al.*, 1998, Nature, 332:323-324). Tales cambios deben mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. En WO91/09967 se describe un protocolo para la selección de los residuos en las regiones marco aceptoras que pueden necesitar ser cambiadas.

De manera acorde, en un ejemplo, se proporciona un anticuerpo humanizado, donde al menos el residuo en la posición 78 del dominio variable de la cadena pesada (numeración de Kabat) es un residuo donante. En una forma de realización, el residuo 78 del dominio variable de cadena pesada se sustituye por alanina.

La expresión “residuo de donante” tal como se emplea en este documento se refiere a una forma residual del anticuerpo no humano (por ejemplo, anticuerpo murino) que ha donado las CDR.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo humanizado donde el dominio variable de cadena pesada no contiene residuos de donante.

De acuerdo con ello, en un ejemplo, se proporciona un anticuerpo humanizado, en el que al menos uno de los residuos en las posiciones 38, 71 y 87 del dominio variable de cadena ligera (numeración de Kabat) son residuos de donante. En una forma de realización, uno de los residuos seleccionados de entre los residuos en las posiciones 38, 71 y 87 del dominio variable de la cadena ligera (numeración de Kabat) es un residuo de donante. En una forma de realización, dos de los residuos seleccionados de entre los residuos en las posiciones 38, 71 y 87, por ejemplo 38 y 71; o 38 y 87; o 71 y 87, del dominio variable de la cadena ligera (numeración de Kabat) son residuos de donante. En una forma de realización, los tres residuos en las posiciones 38, 71 y 87 del dominio variable de la cadena ligera (numeración de Kabat) son residuos de donante.

En una forma de realización, el residuo 38 del dominio variable de cadena ligera se sustituye con lisina. En una forma de realización alternativa, el residuo 38 del dominio variable de cadena ligera se sustituye con glutamina.

En una forma de realización, el residuo 71 del dominio variable de cadena ligera se sustituye con tirosina.

En una forma de realización, el residuo 87 del dominio variable de cadena ligera se sustituye con fenilalanina.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo humanizado donde sólo el residuo 71 de la región variable de cadena ligera es un residuo de donante, preferentemente tirosina.

En una forma de realización particular, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CSF-1R o fragmento de unión del mismo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia del dominio variable de cadena pesada incluida en SEQ ID NO: 23 y una cadena ligera que comprende la secuencia del dominio variable de cadena ligera incluida en SEQ ID NO: 15.

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

En una forma de realización, la descripción proporciona una secuencia de anticuerpo que es 80% similar o idéntica a una secuencia descrita en este documento, por ejemplo 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% sobre una parte o la totalidad de la secuencia relevante. En una forma de realización, la secuencia relevante es la SEQ ID NO: 15. En una forma de realización, la secuencia relevante es la SEQ ID NO: 23.

“Identidad”, tal como se usa en este documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. “Similitud”, como se usa en este documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo pueden ser sustituidos unos por los otros incluyen, pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

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

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de unión del mismo y pueden ser, pero no se limitan a, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VII o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri o tetra-valentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para la creación y la fabricación de estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en el arte (ver, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216:165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO05/003169, WO05/003170 y WO05/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

La expresión “fragmento de unión de un anticuerpo”, tal como se emplea en este documento, se refiere a un fragmento capaz de unirse a un antígeno con afinidad para caracterizar el fragmento como específico para el antígeno.

En una forma de realización, el anticuerpo de acuerdo con la presente descripción, se proporciona como proteína de fusión de anticuerpo de unión a CSF-1R que comprende una fracción de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAb) unidos directa o indirectamente a los mismos, por ejemplo, como se describe en WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y WO2011/086091 todos los cuales se incorporan al presente documento por referencia.

En una forma de realización, la proteína de fusión comprende dos anticuerpos de dominio, por ejemplo, como un par variable pesada (VH) y variable ligera (VL), opcionalmente unidos por un enlace disulfuro.

En una forma de realización, el elemento Fab o Fab' de la proteína de fusión tiene la misma o similar especificidad para el anticuerpo o los anticuerpos de dominio único. En una forma de realización, el Fab o Fab' tiene una especificidad diferente al anticuerpo o anticuerpos de dominio único, es decir la proteína de fusión es multivalente. En una forma de realización, una proteína de fusión multivalente de acuerdo con la presente invención tiene un sitio de unión a albúmina, por ejemplo un par VHNL en ella proporciona un sitio de unión a albúmina.

Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que se pueden requerir. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humana. En especial, se pueden utilizar los dominios de la región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada para usos terapéuticos y se necesitan funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, se pueden usar los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada para fines terapéuticos y no se necesitan funciones efectoras de anticuerpos.

En una forma de realización específica, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG2 o IgG4.

Se apreciará que también se pueden usar las variantes de secuencias de estos dominios de región constante. Por ejemplo, se pueden utilizar moléculas de IgG4 en las que la seria en la

posición 241 se ha cambiado a prolina como se describe en Angal *et al.*, 1993, *Molecular Immunology*, 1993, 30:105-108. De acuerdo con ello, en la forma de realización en la que el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, el anticuerpo puede incluir la mutación S241P.

También un experto en la técnica entenderá que los anticuerpos pueden someterse a una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y el alcance de estas modificaciones a menudo dependen de la línea de células huésped utilizada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxilo-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo puede estar ausente.

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

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

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

También la presente invención proporciona una región específica o epítopo de CSF-1R humano que está unido por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un

anticuerpo 969.g2 que comprende la secuencia de cadena pesada gH2 (SEQ ID NO: 27) y/o la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 19).

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

Las moléculas biológicas, tales como anticuerpos o fragmentos, contienen grupos funcionales ácidos y/o básicos, dando así a la molécula una carga positiva o negativa neta. La cantidad de carga general “observada” dependerá de la secuencia de aminoácidos absoluta de la entidad, el medio ambiente local de los grupos cargados en la estructura 3D y las condiciones ambientales de la molécula. El punto isoelectrico (pI) es el pH en el que una molécula particular o superficie accesible al disolvente de las mismas no lleva carga eléctrica neta. En un ejemplo, el anticuerpo de CSF-1R y los fragmentos de la invención pueden ser diseñados para tener un punto isoelectrico apropiado. Esto puede dar lugar a anticuerpos y/o fragmentos con propiedades más sólidas, en particular, solubilidad adecuada y/o perfiles de estabilidad y/o características de purificación mejoradas.

Así, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo CSF-1R humanizado diseñado para tener un punto isoelectrico diferente al del anticuerpo identificado originalmente. El anticuerpo puede, por ejemplo, ser diseñado mediante la sustitución de un residuo de aminoácido, tal como la sustitución de un residuo de aminoácido de carácter ácido por uno o más residuos de aminoácidos básicos. Alternativamente, se pueden introducir residuos de

aminoácidos básicos o se pueden quitar residuos de aminoácidos ácidos. Alternativamente, si la molécula tiene un valor inaceptablemente alto de pI, se pueden introducir residuos ácidos para bajar el pI, según se requiera. Es importante que al manipular el pI se ponga cuidado en conservar la actividad deseable del anticuerpo o fragmento. Así, en una forma de realización, el fragmento o anticuerpo genotecnológico tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que el anticuerpo o fragmento “no modificado”.

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

Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención puede alterarse usando cualquier método adecuado conocido en el arte. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada para CSF-1R. Tales variantes se pueden obtener por una serie de protocolos de maduración de afinidad, incluyendo mutación de las CDR (Yang *et al.*, 1995, J. Mol. Biol., 254:392-403), intercambio de cadenas (Marks *et al.*, 1992, Bio/Technology, 10:779-783), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low *et al.*, 1996, J. Mol. Biol., 250:359-368), intercambio de ADN (Patten *et al.*, 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8:724-733), presentación en fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer *et al.*, 1998, Nature, 391:288-291). Vaughan *et al.* (*supra*) discute estos métodos de maduración de afinidad.

Si se desea, se puede conjugar un anticuerpo para uso en la presente invención a una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas unidas de tal manera que formen una única fracción que pueda unirse a los anticuerpos de la presente invención. En los casos en que se desee obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, este se puede preparar mediante procedimientos estándar de químicos o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo está unido directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras a anticuerpos son bien conocidas en el arte (véase, Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 and Dubowchik *et al.*, 1999,

Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en WO93/06231, WO92/22583, WO89/00195, WO89/01476 y WO03/031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido el enlace puede conseguirse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en WO86/01533 y EP0392745.

El término “molécula efectora” como se utiliza en este documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopia de NMR o ESR.

Ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, que las mata). Ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas) y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

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

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

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

En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en WO05/117984.

En una forma de realización, una semivida proporcionada por una molécula efectora que es independiente de CSF-1R es ventajosa.

Cuando la molécula efectora es un polímero, puede, en general, ser un polímero sintético o un polímero de origen natural, por ejemplo, un polímero de polioxialquileno, polialquileno o polialquenileno de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un horno-polisacárido o hetero-polisacárido.

Sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxilo.

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

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

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

El término “derivados” tal como se usa en este documento pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos tiol-selectivos tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar vinculado directamente o a través de un segmento de enlace al polímero. Se apreciará que el residuo de un grupo de este tipo en algunos casos formará parte del producto como grupo de enlace entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero generalmente estará en un rango de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, por ejemplo, de 5000 a 40000 Da, tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular sobre la base del uso previsto del producto, por ejemplo, capacidad de localizarse en ciertos tejidos tales como tumores o de extender la semivida en la circulación (para revisión, ver Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando el producto está destinado a dejar la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo, con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en

la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

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

En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención están unidos a fracciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir mediante cualquier cadena lateral de aminoácidos o grupo funcional de aminoácidos terminal disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden producirse de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden ser diseñados en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, las patentes US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado donde la modificación consiste en la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Adecuadamente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que la molécula efectora se puede unir. Se pueden utilizar sitios múltiples para unir dos o más moléculas de PEG.

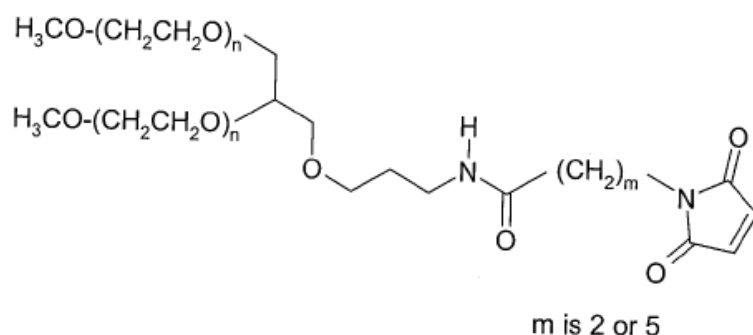
Adecuadamente, las moléculas de PEG están unidas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente generalmente será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se utilice un grupo tiol como el punto de unión, se pueden utilizar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo, derivados selectivos del tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Un polímero activado puede usarse como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímeros, tal como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, por ejemplo, iodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una

sulfona de vinilo o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina 20K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una forma de realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado, fragmento Fab' o diFab que es PEGilado, es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en EP 0948544 o EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina puede unirse un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser, por lo tanto, de aproximadamente 40000 Da.

Moléculas particulares de PEG incluyen 2-[3-(N-maleimido) propionamido]etil amida de lisina modificada N, N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) MW 20000, también conocida como PEG2MAL4OK (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

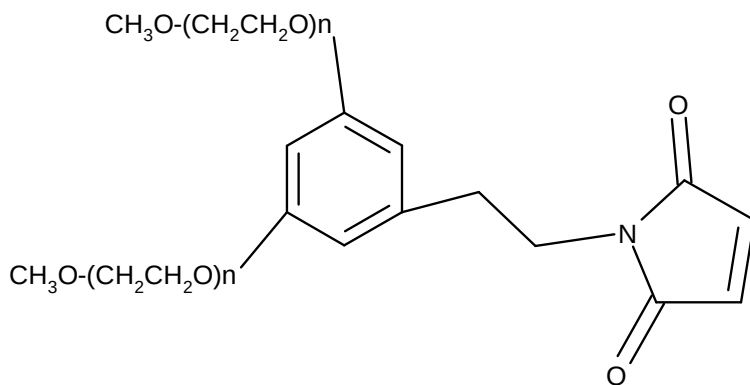
Las fuentes alternativas de enlazadores de PEG incluyen NOF que suministran GL2-400MA3 (donde m en la estructura de abajo es 5) y GL2-400MA (donde m es 2) y n es de aproximadamente 450:



Es decir, cada PEG es de aproximadamente 20000 Da.

Por consiguiente, en una forma de realización, el PEG es 2,3-Bis(metilpolioxietilen-oxi)-1-{[3-(6-maleimido-1-oxohexil)amino]propiloxi} hexano (el PEG ramificado de dos brazos, -CH₂)₃NHCO(CH₂)₅-MAL, Mw 40000 conocido como SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Otras moléculas efectoras de PEG alternativas del tipo siguiente:



En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo, tal como un anticuerpo de longitud completa, que es PEGilado (por ejemplo, con un PEG descrito en el presente documento), unido a través de un residuo de aminoácido de cisteína en el aminoácido 226 en la cadena o aproximadamente en dicha ubicación, por ejemplo en el aminoácido 226 de la cadena pesada (por numeración secuencial).

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

Las moléculas de Fab-PEG de acuerdo con la presente descripción pueden ser particularmente ventajosas por tener una semivida independiente del fragmento Fc.

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

En una forma de realización, el anticuerpo o fragmento está conjugado a una molécula de almidón, por ejemplo para aumentar la semivida. Los métodos para conjugar almidón a una proteína tal como se describe en US 8,017,739 se incorporan al presente por referencia.

Una molécula indicadora, tal como dicho término se emplea en el presente documento, es una molécula que es capaz de ser detectada, por ejemplo, un colorante fluorescente, marcador radiactivo u otra entidad detectable.

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

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

El ADN que codifica las secuencias del marco aceptor se encuentra ampliamente disponible para los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente sobre la base de sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Las técnicas estándar de biología molecular se pueden usar para preparar secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de

oligonucleótidos. Se pueden utilizar técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y mutagénesis dirigida al sitio según sea apropiado.

En la Figura 1 se incluyen ejemplos de secuencias de ADN adecuadas.

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

Los métodos generales por los que los vectores se pueden construir, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. En este sentido, se hace referencia a “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F.M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, Nueva York y al Manual Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Cualquier sistema adecuado de células huésped/vectores puede usarse para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o sistemas de expresión de células huésped eucariotas, por ejemplo de mamífero, también se puede usar. Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para lograr la expresión de la proteína de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo se necesita utilizar una secuencia de codificación de polipéptidos de cadena pesada o ligera para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprenden cadenas tanto pesadas como ligeras, la línea celular puede transfectarse con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, puede utilizarse un único vector, vector que incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente descripción se expresan en buenos niveles a partir de células huésped. Por lo tanto las propiedades de los anticuerpos y/o fragmentos de unión son adecuados para la expresión en una escala comercial.

Por lo tanto se proporciona un proceso para el cultivo de una célula huésped y la expresión de un anticuerpo o fragmento de la misma, el aislamiento de esta última y, opcionalmente, la purificación de la misma para proporcionar un anticuerpo o fragmento aislado. En una forma de realización, el procedimiento comprende además la etapa de conjugar una molécula afectora al anticuerpo o fragmento aislado, por ejemplo, conjugar a un polímero de PEG, en particular, como se describe en el presente documento.

En una forma de realización, se proporciona un proceso para la purificación de un anticuerpo (en particular, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención) que comprende realizar una cromatografía de intercambio aniónico en modo no enlazante de tal manera que las impurezas sean retenidas en la columna y el anticuerpo se eluya.

En una forma de realización, la purificación utiliza captura de afinidad en una columna de CSF-1R.

En una forma de realización, la purificación emplea Cibacron Blue o un producto similar para la purificación de moléculas de fusión de albúmina o conjugados.

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

El procedimiento puede comprender además una etapa de captura inicial empleando cromatografía de intercambio catiónico, realizada por ejemplo a un pH de aproximadamente de 4 a 5, tal como 4,5. La cromatografía de intercambio catiónico puede, por ejemplo, emplear una resina tal como resina CaptoS o SP sepharose FF (suministrada por GE-Healthcare). El

anticuerpo o fragmento puede entonces eluirse de la resina empleando una solución de sal iónica, tal como cloruro de sodio, por ejemplo a una concentración de 200 mM.

Así, la etapa o las etapas de cromatografía pueden incluir una o más etapas de lavado, según corresponda.

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

Así, en una forma de realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento anti-CSF-1R purificado, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o fragmento, en particular, un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención, en forma sustancialmente purificada, en particular, libre o sustancialmente libre de endotoxina y/o proteína de célula huésped o ADN.

La expresión “forma purificada”, tal como se utiliza arriba en el presente documento, pretende referirse a al menos 90% de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p o más pura.

La expresión “sustancialmente libre de endotoxina” pretende generalmente referirse a un contenido de endotoxina de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 0,5 o 0,1 EU por mg de producto.

La expresión “sustancialmente libre de proteínas de célula huésped o ADN” pretende generalmente referirse a un contenido de proteínas de célula huésped y/o ADN de 400 µg por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100 µg por mg o menos, en particular 20 µg por mg, según sea apropiado.

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

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

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

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

El anticuerpo de acuerdo con la descripción se puede utilizar para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hueso, mieloma, cáncer colorrectal, leucemia, linfoma, cáncer de piel tal como melanoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer astrocítico, cáncer endometrial, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas y cáncer de ovario.

En una forma de realización, el cáncer es cáncer metastásico de cualquiera de los tipos de cáncer originales enumerados anteriormente, en particular, cáncer de hueso.

Sorprendentemente, se ha podido demostrar que un anticuerpo anti-CSF-1R que inhibe la actividad de CSF-1R es activo en el tratamiento de la enfermedad fibrótica. En concreto, se ha podido demostrar que un anticuerpo anti-CSF-1R es activo en modelos animales de fibrosis pulmonar *in vivo*.

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

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

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de un sujeto humano que padece o sufre riesgo de padecer enfermedad fibrótica, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la descripción.

En la presente solicitud, el término “enfermedad fibrótica” incluye enfermedades que se caracterizan por una respuesta anormal a la cicatrización de una herida, donde se forma un exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido. Enfermedades fibróticas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, fibrosis pulmonar, tal como fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística, fibrosis renal, incluyendo atrofia tubular y fibrosis intersticial, fibrosis hepática, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis endomiocárdica,

fibrosis mediastínica, mielofibrosis , fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, infarto de miocardio, esclerodermia, esclerosis sistémica y artrofibrosis.

En una forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de acuerdo con la descripción se emplean en el tratamiento o la profilaxis de cáncer o enfermedad fibrótica.

El anticuerpo de acuerdo con la descripción puede ser utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, como por ejemplo, artritis inflamatoria, aterosclerosis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, espondilitis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, osteoartritis, eczema, dermatitis de contacto, psoriasis, síndrome del choque tóxico, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, asma, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, osteoporosis, reestenosis, lesión de reperfusión cardíaca y renal, trombosis, glomerulonefritis, diabetes, reacción injerto contra huésped, rechazo de aloinjertos, esclerosis múltiple, degeneración muscular, distrofia muscular, enfermedad de Alzheimer y accidentes cerebrovasculares.

Los anticuerpos y fragmentos de acuerdo con la presente descripción se pueden emplear para tratamiento o profilaxis.

La molécula de anticuerpo de la presente invención también puede usarse en el diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico *in vivo* y diagnóstico por imagen de estados de enfermedad que involucran CSF-1R.

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

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de

anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar en combinación, por ejemplo, de forma simultánea, secuencial o separada, con uno o más de otros ingredientes terapéuticamente activos. De manera acorde, la molécula de anticuerpo en la composición farmacéutica o de diagnóstico puede estar acompañada de otros ingredientes activos incluyendo otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo, familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER-2), receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), anticuerpos de receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), o ingredientes no anticuerpos tales como imatinib, dasatinib, nioltinib, basutinib, gefitinib, erlotinib, temsirolimus, vandetanib, vemurafenib, crizotinib, vorinostat, romidepsin, bortezomib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, regorafenib, cabozantinib, Perfenidona, esteroides u otras moléculas de fármaco, en particular, las moléculas de fármaco cuya semivida es independiente de la unión a CSF-1R.

La expresión ingrediente activo, tal como se emplea aquí, se refiere a un ingrediente con un efecto farmacológico, tal como un efecto terapéutico, a una dosis relevante.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de manera adecuada una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usa en este documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana, o para exhibir un efecto terapéutico, farmacológico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información puede entonces ser utilizada para determinar las dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse

mediante experimentación rutinaria y se encuentra dentro del criterio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz irá de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como 100mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las dosis terapéuticas de los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción no muestran efectos toxicológicos aparentes o limitados *in vivo*.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

En una forma de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión de acuerdo con la presente descripción se emplean con una o más de otras opciones para el tratamiento del cáncer, tales como, por ejemplo, quimioterapia, terapia de radiación o cirugía. Si se administra con un agente quimioterapéutico, el anticuerpo se puede administrar antes o después del agente quimioterapéutico o al mismo tiempo. Los tratamientos de quimioterapia que se pueden utilizar en combinación con las proteínas de unión a antígeno que se proporcionan incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes/que dañan el ADN (por ejemplo, carboplatino, cisplatino), antimetabolitos (por ejemplo, capecitabina, gemcitabina, 5-fluorouracilo), inhibidores de la mitosis (por ejemplo, paclitaxel, vincristina).

Los anticuerpos a ser utilizados para tratar diversas enfermedades inflamatorias se pueden usar solos o combinados con varios otros agentes anti-inflamatorios.

Los anticuerpos a ser utilizados para tratar diversas enfermedades fibróticas se pueden usar solos o combinados con varios otros agentes anti-fibróticos. Un ejemplo de tales agentes es Perfedidone.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, la gravedad de la afección presente y de si la molécula de anticuerpo se está utilizando profilácticamente o para tratar una afección existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo 2 a 10 horas) puede ser necesario dar una o más dosis por día. Alternativamente, si la molécula de

anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días) y/o un perfil de farmacodinámica (PD) de larga duración puede ser necesario administrar solamente una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

El término “semivida” tal como se emplea en el presente documento pretende referirse a la duración de la molécula en la circulación, por ejemplo en suero/plasma.

El término “farmacodinámica” tal como se emplea en el presente documento se refiere al perfil y, en particular, la duración de la acción biológica de la molécula de acuerdo con la presente descripción.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas inactivas de virus.

Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones, para ingestión por parte del paciente.

Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más formas de realización, las composiciones están adaptadas para la administración a sujetos humanos.

Adecuadamente, en formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo o fragmento, por ejemplo, si el pH de la formulación es 7, un pI de entre 8-9 o superior puede ser apropiado. Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que ello puede en última instancia proporcionar una formulación final con una estabilidad mejorada, por ejemplo, donde el anticuerpo o fragmento permanece en solución.

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

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por cualquier número de rutas incluyendo, pero sin limitarse a, ruta oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, ver WO98120734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hiposprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administran en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede consistir en un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la

composición se va a administrar por una vía que utiliza el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan al anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que ha sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

Una discusión detallada sobre los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Nueva Jersey, 1991).

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

Preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles de dosificación que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas arriba mencionadas, o en una mezcla de las sustancias activas antes mencionadas con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo dextranos), polialcoholes (por ejemplo sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Adecuadamente se usan mono o disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, en particular, pero no exclusivamente, en la forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula de menos de 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo de 0,1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de importancia primordial.

Los gases propelentes que se pueden usar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en el arte. Los gases propelentes adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano e hidrocarburos halogenados tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes mencionados anteriormente pueden utilizarse por sí solos o en mezclas de los mismos.

Gases propelentes particularmente adecuados son los derivados de alcano halogenados seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados

anteriormente citados, son particularmente adecuados TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizadores, agentes activos de superficie (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en el arte.

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

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

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

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

Esto puede incluir la producción y la esterilización por filtración del disolvente/disolución tamponado utilizado para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de disolvente tamponado estéril, y la dispensación de la formulación en recipientes estériles mediante métodos que resultan familiares para los expertos en la técnica.

Se puede proporcionar una formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, contenedores de plástico sellados o ampollas) envasados en sobres de papel de aluminio. Cada ampolla contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 mL, de tampón de disolvente/solución.

Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser adecuados para la administración mediante nebulización.

También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se pueda administrar mediante el uso de la terapia génica. Con el fin de lograr este propósito, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente de tal manera que las cadenas de anticuerpo se expresan a partir de las secuencias de ADN y se ensamblan *in situ*.

En una forma de realización, la presente descripción comprende el uso de anticuerpos o fragmentos de los mismos como un reactivo o diagnóstico, por ejemplo, conjugado con una molécula indicadora. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la descripción que se etiqueta. En un aspecto, se proporciona una columna que comprende un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la descripción.

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

- 1) la purificación de la proteína CSF-1R (o fragmento de unión de la misma) - conjugándose a una matriz y utilizándose como una columna de afinidad, o (como una forma modificada de anti-CSF-1R) como un agente de precipitación (por ejemplo, como una forma modificada con un dominio reconocido por otra molécula, que puede modificarse), que opcionalmente se precipita mediante un reactivo anti-Fc)

- 2) la detección y/o cuantificación de CSF-1R sobre las células o en las células, vivas o fijas (células *in vitro* o en secciones de tejidos o células). Los usos de este procedimiento pueden incluir la cuantificación de CSF-1R como biomarcador, para seguir el efecto del tratamiento con anti-CSF-1R. Para tales propósitos, el candidato puede usarse en una forma

modificada (por ejemplo, mediante la adición de otra fracción, como una proteína de fusión genética o conjugado químico, tales como la adición de una molécula indicadora, por ejemplo una etiqueta fluorescente utilizada para fines de detección).

3) purificación o clasificación de células portadoras de CSF-1R marcadas mediante la unión a candidato modificado en las formas ejemplificadas en (1) y (2).

“Que comprende”, en el contexto de la presente descripción, significa que incluye.

Cuando ello sea apropiado desde el punto de vista técnico, las formas de realización de la invención pueden combinarse.

Las formas de realización se describen en el presente documento en el sentido de comprender ciertas características/elementos. La descripción también se extiende a formas de realización separadas que consisten o consisten esencialmente en dichas características/elementos.

Las referencias técnicas tales como patentes y solicitudes se incorporan al presente documento por referencia.

Cualesquiera formas de realización específicas y explícitamente mencionadas en el presente documento pueden constituir la base de un descargo de responsabilidad, ya sea por sí solas o en combinación con una o más realizaciones adicionales.

La presente invención se describe con más detalle a modo de ilustración únicamente en los siguientes ejemplos, que hacen referencia a las siguientes Figuras:

- Figuras 1A a 1F** muestran ciertas secuencias de aminoácidos y polinucleótidos.
- Figura 2A y 2B** muestran alineaciones de ciertas secuencias.
- Figura 3** muestra la secuencia de dominio extracelular de CSF-1R humano codificado por un polinucleótido empleado para transfectar células y que expresa la proteína sobre la superficie de la célula. Luego se emplearon estas células para inmunizar animales huésped.
- Figura 4** muestra la inhibición de la unión de CSF-1 a células THP-1 por el anticuerpo Ab969.
- Figura 5a** muestra la inhibición de la supervivencia y la proliferación impulsada por CSF-1 de los monocitos humanos primarios, por el anticuerpo Ab969.
- Figura 5b** muestra la inhibición de la supervivencia y la proliferación impulsada por IL-34 de los monocitos humanos primarios, por el anticuerpo Ab969.

- Figura 6** muestra la inhibición de la supervivencia y la proliferación impulsada por CSF-1 de los monocitos murinos primarios, por el anticuerpo Ab535.
- Figura 7** muestra los niveles de CSF-1R en superficie celular en células THP-1 incubadas con Ab969, CSF-1 humano y un control de isotipo.
- Figura 8** muestra el nivel relativo de CSF-1R en superficie celular en células THP-1 tratadas con Ab969 en comparación con un control de isotipo.
- Figura 9** muestra los niveles de CSF-1R en superficie celular en células RAW264.7 incubadas con Ab 535, CSF-1 y un control de isotipo.
- Figura 10** muestra el nivel relativo de CSF-1R en superficie celular en células RAW264.7 tratadas con Ab535 en comparación con un control de isotipo.
- Figura 11** muestra el nivel de fosforilación de CSF-1R en células HEK293F transfectadas con CSF-R tras estimulación con CSF-1 o tratamiento con Ab969.
- Figura 12** muestra el nivel de secreción de MCP-1 a partir de monocitos humanos primarios cuando se incubaron con Ab969 y con CSF-1.
- Figura 13** muestra el efecto sobre la inhibición de la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 por el anticuerpo humanizado 969.g5 en comparación con Ab969.g0 quimérico.
- Figura 14** muestra el efecto sobre la inhibición de la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1 de diversos injertos de anticuerpos humanizados de Ab969.
- Figura 15a** muestra la concentración de CSF-1 en muestras de suero tomadas de monos *cynomolgus* tratados con una dosis intravenosa única de 7 mg/kg de Ab969.g2.
- Figura 15b** muestra la concentración de CSF-1 en muestras de suero tomadas de monos *cynomolgus* tratados con una dosis intravenosa única de 1,5 mg/kg de Ab969.g2.
- Figura 15c** muestra el efecto de la administración del anticuerpo Ab969.g2 a monos *cynomolgus* en dosis de 7 mg/kg y 1,5 mg/kg sobre los monocitos circulantes no clásicos en diferentes puntos de tiempo.
- Figura 16** muestra el efecto antitumoral del anticuerpo Ab535, frente a un anticuerpo de control, un control positivo y el control del vehículo en ratones

rasurados inmunodeficientes portadores de transplantes subcutáneos del xenoinjerto de cáncer de mama humano MCF-7.

- Figura 17** muestra la eficacia antitumoral del anticuerpo Ab535 frente a un anticuerpo de control, un control positivo y el control del vehículo en un modelo ortotópico de cáncer de próstata PC-3.
- Figura 18a** muestra el efecto del tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 sobre la concentración de colágeno BALF en comparación con un control de isotipo.
- Figura 18b** muestra el efecto del tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 sobre la patología fibrótica de muestras de pulmón, medido por la puntuación de Ashcroft en comparación con un control de isotipo.
- Figura 18c** muestra el efecto del tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 sobre la concentración de albúmina en el suero en comparación con un control de isotipo.
- Figura 18d** el número de macrófagos en el líquido de BAL de los ratones de un estudio de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo el número de macrófagos en el líquido de BAL en comparación con los animales tratados con el control de isotipo. Datos mostrados como medias $\pm$ SEM; * Indica diferencia significativa con respecto al isotipo de solución salina; # indica diferencia significativa con respecto a ratones tratados con bleomicina dosificados con anticuerpo de control de isotipo ($p < 0,05$)
- Figura 19** imágenes representativas del análisis histopatológico de pulmones de animales tratados con control de solución salina, bleomicina más control de isotipo y bleomicina más Ab535.
- Figura 20a** muestra el efecto del tratamiento con Ab535 de ratones con deficiencia de ADA que sufren de fibrosis pulmonar inducida sobre la concentración de colágeno en BALF en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.
- Figura 20b** muestra el efecto del tratamiento con Ab535 de ratones con deficiencia de ADA que sufren de fibrosis pulmonar inducida sobre la patología de muestras de pulmón, medido por la puntuación de Ashcroft en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.

- Figura 20c** muestra el efecto del tratamiento con Ab535 de ratones con deficiencia de ADA que sufren de fibrosis pulmonar inducida sobre la concentración de albúmina en el suero en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.
- Figura 20d** muestra el número de macrófagos en el líquido de BAL de los ratones de un modelo de fibrosis pulmonar con deficiencia de ADA y muestra que el tratamiento con Ab535 de ratones con deficiencia de ADA que sufren de fibrosis pulmonar inducida redujo el número de macrófagos en el líquido de BAL.
- Figura 21** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de pulmones de ratones normales (ADA⁺) y ratones con deficiencia de ADA que sufren de fibrosis pulmonar inducida (ADA⁻), ambos tratados con control de isotipo o con Ab535.

EJEMPLOS

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

Inmunización:

Se inmunizaron ratas hembra Sprague Dawley con fibroblastos de rata RFL6 singénicos que habían sido transfectados de forma transitoria con un vector que expresa el dominio extracelular de CSF-1R humano unido a un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). La Figura 3 muestra la SEQ ID NO: 39 que es la secuencia de dominio extracelular de CSF-1R humano utilizado en la inmunización de ratas.

Las ratas recibieron cinco vacunas subcutáneas a intervalos de tres semanas de $3-9 \times 10^6$ células transfectadas por animal. Se inyectó Adyuvante Completo de Freund (50% en PBS) en un sitio adyacente con la primera inmunización con células. Dos semanas después de la inmunización final se recogieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y los bazo.

Detección primaria de sobrenadantes de anticuerpo

Los sobrenadantes de anticuerpos se examinaron inicialmente para determinar su capacidad para unirse a CSF-1R humano expresado en células HEK293 transfectadas mediante tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorescente (FMAT).

Se identificaron aproximadamente 1000 pocillos con reactividad anti-CSF-1R en una detección FMAT primaria con placas de 600 x 96 pocillos. En total, aproximadamente 3×10^8

células B (esplenocitos de rata) se examinaron para determinar la producción de anticuerpos de unión a CSF-1R por FMAT.

Detección secundaria de sobrenadantes de anticuerpos

Se diseñó un ensayo de rendimiento medio para identificar pocillos FMAT-positivos que contenían actividad anti-CSF-1R de neutralización, es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de impedir la unión de CSF-1 humano al receptor de CSF-1R humano. Se incubaron sobrenadantes de anticuerpo con células THP-1 que expresan CSF-1R antes de la incubación con CSF-1 humano. El nivel de unión de CSF-1 a células THP-1 se midió mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo policlonal anti-CSF-1. Los sobrenadantes de anticuerpos irrelevantes se utilizaron como controles negativos.

La detección secundaria se aplicó a sobrenadantes de 779 pocillos de anticuerpos y 88 de estos pocillos demostraron actividad de bloqueo de CSF-1 detectable.

Detección terciaria de sobrenadantes de anticuerpos

Los sobrenadantes de anticuerpo que habían mostrado actividad neutralizante en la detección secundaria fueron ensayados para determinar su capacidad de impedir la supervivencia de monocitos humanos primarios dependiente de CSF-1. Los monocitos se purificaron a partir de sangre humana y se incubaron 1×10^4 células con cada sobrenadante de anticuerpo en presencia de 20 ng/ml de CSF-1 humano. Después de una incubación de 72 horas, se midió el número de monocitos viables mediante ensayo CellTiter Glo.

La detección terciaria se aplicó a los sobrenadantes de 59 de los pocillos de anticuerpos identificados en la detección secundaria y los 18 pocillos demostraron una capacidad para reducir la supervivencia de monocitos mediada por CSF-1.

Clonación de regiones variables de anticuerpos y reanálisis de actividad de bloqueo

Se intentó la clonación de la región variable (región V) de los 18 pocillos de anticuerpos que demuestran la actividad neutralizante de CSF-1. Las regiones V pesadas y ligeras de inmunoglobulina se amplificaron por RT-PCR usando cebadores específicos para las regiones constantes de anticuerpos de rata y un conjunto de cebadores redundantes que hibrida con secuencias que codifican péptidos líder de inmunoglobulina de rata. Los genes de regiones V fueron recuperados de 14 anticuerpos y se clonaron en vectores de expresión de IgG4 humana de cadena pesada y cadena ligera.

Se transfectaron transitoriamente pares de vectores de anticuerpos en células HEK293F y se ensayó el medio acondicionado para determinar la actividad neutralizante de CSF-1 en células THP-1 (tal como se describió anteriormente). Nueve de los anticuerpos tuvieron la capacidad de inhibir parcial o totalmente la unión de CSF-1 en comparación con el medio condicionado de control.

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

Los nueve anticuerpos neutralizantes se secuenciaron para evaluar la diversidad de secuencias. Todos los nueve anticuerpos eran únicos. Estos anticuerpos se clonaron y se expresaron para estudios de perfiles adicionales.

Ejemplo 2 - Propiedades *In Vitro* de Ab969 quimérico anti-CSF-1R humano y Ab535 anti-CSF-1R murino

i) Ab969 quimérico de expresión

Las regiones variables de los nueve anticuerpos neutralizantes identificados en el Ejemplo 1 se clonaron en vectores de expresión de cadena pesada y ligera por separado y se expresaron como anticuerpos de Ig04 humana de longitud completa.

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

Los anticuerpos se expresaron mediante cotransfección transitoria de pares de vectores de cadena pesada y ligera concordantes en células CHO-K1. La purificación de los anticuerpos en PBS de pH 7,4 se realizó de manera tal que el nivel de agregado en la preparación final fuera menos de 1%.

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

ii) Ensayo de bloqueo de ligandos

La capacidad de cada uno de los nueve anticuerpos para inhibir la unión de CSF-1 a células THP-1 se evaluó mediante citometría de flujo. Se incubaron células THP-1 con cada

anticuerpo a 0,5, 0,125, 0,031, 0,0078 y 0,00195 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos. Un anticuerpo IgG4 irrelevante sirvió como control de isotipo. Después del lavado, las células se incubaron con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de CSF-1 humano durante 30 minutos. Después de un lavado adicional, se detectó CSF-1 unido mediante incubación secuencial con anticuerpo anti-CSF-1 biotinilado y estreptavidina conjugada con Alexa488. Se midió el ligando unido al receptor mediante citometría de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia mediana (MFI).

Este ensayo identificó cuatro anticuerpos, incluyendo Ab969, que fueron superiores a los anticuerpos restantes analizados, demostrando la inhibición completa de la unión de CSF-1 a una concentración de 31,3 ng/ml. Los resultados para Ab969 se muestran en la Figura 4.

iii) *Inhibición de CSF-1- y supervivencia de monocitos mediada por IL-34*

Anti-CSF-1R humano:

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

Se prepararon PBMCs humanas a partir de sangre entera humana fresca en un gradiente de Ficoll y se purificaron los monocitos mediante selección negativa. Los monocitos se incubaron con 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo y 20 ng/ml de CSF-1 durante 72 horas y se determinó el número relativo de células viables utilizando análisis CellTiter Glo. La lectura de la luminiscencia se correlaciona con el número de células viables. Los resultados se muestran en la Figura 5a.

Se prepararon PBMCs humanas a partir de sangre entera humana fresca en un gradiente de Ficoll y se purificaron los monocitos mediante selección negativa. Los monocitos se incubaron con 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo y 20 ng/ml de IL-34 durante 72 horas y se determinó el número relativo de células viables utilizando análisis CellTiter Glo. La lectura de la luminiscencia se correlaciona con el número de células viables. Los resultados se muestran en la Figura 5b.

Cuatro de los anticuerpos incluyendo Ab969 demostraron inhibición superior de la supervivencia de monocitos en comparación con los anticuerpos restantes, tanto para la estimulación con CSF-1 (Figura 5a) como con IL-34 (Figura 5b), de forma consistente con sus actividades de bloqueo de ligando.

Anti-CSF-1R de ratón:

Se purificaron monocitos CD1 lb⁺ primarios murinos a partir de bazos de ratones. Los monocitos se incubaron luego con una titulación de CSF-1 murino (mCSF-1) durante 24 horas. La liberación de MCP-1 en el medio celular se midió mediante ELISA y se demostró una liberación dependiente de la dosis de MCP-1 mediante mCSF-1. En una rama separada del estudio, se añadieron 10 µg/ml de Ab535 CSF-1R anti-murino junto con la titulación de mCSF-1. La liberación de MCP-1 fue completamente inhibida por el Ab535 en todas las concentraciones de CSF-1 ensayadas (Figura 6).

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

Conclusión: el tratamiento de monocitos murinos con CSF-1 causó una liberación dependiente de la dosis de MCP-1, que fue completamente inhibida por el tratamiento con 10 µg/ml de Ab535. El Ab535 inhibe la liberación de MCP-1 impulsada por CSF-1 en monocitos murinos en una forma dependiente de la dosis, con una IC₅₀ media de 8,08 ng/ml (n = 2). Este valor de IC₅₀ es similar al mostrado por los anticuerpos anti-CSF-1R humanos.

iv) *Afinidad*

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

El formato de ensayo fue de captura de los anticuerpos anti-CSF-1R por anti-IgG humana inmovilizada, F(ab')₂, luego una titulación de hCSF-1R/Fc sobre la superficie capturada. Se realizó un BIA (Análisis de Interacción Biomolecular) utilizando un BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Todos los experimentos se realizaron a 25°C. Se inmovilizó Affinipure F(ab')₂ fragmento cabra anti-IgG humana F(ab')₂ fragmento específico (Jackson ImmunoResearch) sobre un chip sensor CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de ~5000 unidades de respuesta (RU). Se utilizó tampón HBS-EP (HEPES 10mM pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 0,005%, GE Healthcare Bio-Sciences AB) como tampón de desplazamiento con una velocidad de flujo de

10 μ l/min. Se administró una inyección de un anticuerpo anti-CSF-1R para dar un nivel de captura de aproximadamente 100 RU en la anti-IgG humana inmovilizada, F(ab)₂.

Se hizo pasar CSF-1R/Fc humana recombinante (R&D Systems) sobre el anticuerpo anti-CSF-1R capturado a 5 nM a una velocidad de flujo de 30 μ l/min durante 5 minutos y luego se aumentó la velocidad de flujo a 100 μ l/min durante 30 minutos para la fase de disociación. Se administró la inyección a 5nM dos veces junto con un control de tampón correspondiente. Estos sensogramas se utilizaron para generar la velocidad de disociación. Se tituló CSF-1R/Fc humana recombinante sobre el anticuerpo anti-CSF-1R capturado de 2,5 nM a una velocidad de flujo de 30 μ l/min durante 5 min seguido de una fase de disociación de 10min. Estos sensogramas se utilizaron para generar la velocidad de asociación. La superficie se regeneró a una velocidad de flujo de 10 μ l/min mediante una inyección de 10 μ l de HC1 40mM seguido por una inyección de 5 μ l de NaOH 10mM. Se analizaron las curvas de unión restadas de fondo de doble referencia usando el software BIAevaluation (versión 4.1) siguiendo procedimientos estándar. Se determinaron los parámetros cinéticos a partir del algoritmo de ajuste.

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

Tabla 1:

Anticuerpo	C. de asociación K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	C. de disociación K_d (s^{-1})	Afinidad K_D (M)	Afinidad K_D (pM)
Ab969	2.58×10^6	2.49×10^{-5}	9.65×10^{-12}	9.6
Ab535	2.24×10^6	1.06×10^{-5}	4.73×10^{-12}	4.7

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

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

Tabla 2

Anticuerpo	Afinidad basada en células $K_D \pm S.D.$ (nM)	Afinidad BIAcore K_D (pM)
Ab969	2.20 ± 0.19	4.80

v) *Inhibición de unión de CSF-1 (IC_{50})*

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

Tabla 3

Anticuerpo	Media $IC_{50} \pm S.D.$ /Desviación estándar/ (ng/ml)
Ab969	2.89 ± 1.22

vi) *Reactividad cruzada de los anticuerpos*

Se ensayaron cuatro anticuerpos para determinar la reactividad cruzada con CSF-1R de mono *rhesus*, mono *cynomolgus* y canino de longitud completa. Todos los cuatro anticuerpos se unieron a CSF-1R de *rhesus* y *cynomolgus* además de a CSF-1R humano, demostrando claramente una unión significativamente por encima del nivel del control de isotipo.

Tabla 4

Anticuerpo	Reactividad cruzada		
	Cynomolgus	Rhesus	Canino
Ab969	Sí	Sí	No

vii) *Internalización de CSF-1R*

Ab969:

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

de CSF-1R en la superficie celular en las células tratadas con Ab969 en comparación con el control de isotipo y ello se muestra en la Figura 8.

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

Las células THP-1 tratadas con Ab969 exhibieron niveles más altos de expresión de CSF-1R en la superficie celular en comparación con las células THP-1 no tratadas y tratadas con control de isotipo durante todo el período de 48 horas. Estos datos sugieren fuertemente que el tratamiento de las células THP-1 con Ab969 no causa la internalización de hCSF-1R expresada en superficie celular hasta 48 horas después del tratamiento.

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

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

Ab535:

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

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

de CSF-1R en la superficie celular en comparación con el control de isotipo y ello se muestra en la **Figura 10**.

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

Se observó una clara reducción de los niveles de mCSF-1R en la superficie celular en las células RAW264.7 tratadas con CSF-1 humano durante 2 horas en relación con las células no tratadas y tratadas con control de isotipo. Esta reducción se mantuvo durante todo el estudio de 48 horas. Esto demuestra que el CSF-1 humano induce la internalización de mCSF-1R y valida el sistema experimental para el seguimiento de la internalización del receptor.

Las células RAW264.7 tratadas con Ab535 exhiben niveles similares de mCSF-1R en la superficie celular en comparación con las células sin tratar y tratadas con control de isotipo durante todo el período de 48 horas. Dado que sería de esperar que la internalización del receptor mediada por anticuerpo se produzca dentro de este plazo, estos datos sugieren fuertemente que el Ab535 no desencadena la internalización de mCSF-1R.

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

viii) *Activación de CSF1-R*

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

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

La línea celular THP-1 representó un punto de partida para el seguimiento del estado de activación de CSF-1R. Sin embargo, el nivel de expresión de CSF-1R en esta línea celular es relativamente bajo, por lo que es difícil llevar a cabo el análisis bioquímico. Por lo tanto se diseñó un sistema experimental de modo que el nivel de fosforilación de CSF-1R pudiera detectarse sólidamente. La fosforilación de CSF-1R puede detectarse en dos residuos de tirosina, Y723 e Y809. Además, la fosforilación de p44/42 MAPK (Erk1/2) en T202 e Y204 se midió como una lectura independiente de la actividad de CSF-1R. La estimulación con CSF-1 se incluyó como un control positivo en todos los experimentos.

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

Las células HEK293F transfectadas a CSF-1R no estimuladas exhibieron un bajo nivel basal de fosforilación de CSF-1R. La estimulación de células con CSF-1 dio como resultado un nivel de fosforilación de CSF-1R en los residuos Y723 y Y809 fácilmente observado mediante análisis de transferencia de Western (Figura 11). Tuvo lugar también una clara estimulación de la fosforilación de ERK1/2 tras el tratamiento con CSF-1. El tratamiento de las células HEK293F transfectadas con anticuerpo Ab969.g0 no estimuló la fosforilación de CSF-1R ni potenció la activación de ERK1/2.

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

Los ensayos bioquímicos descritos previamente utilizaron solamente anticuerpo anti-CSF-1R monomérico. Sin embargo, es posible que una IgG1 reticulada tuviera una capacidad aumentada de acercar las moléculas de CSF-1R y desencadenar la fosforilación de tirosina y la señalización aguas abajo. Para evaluar esto, también se realizó el ensayo de MCP-1 usando Ab969.g0 que había sido reticulado con un anticuerpo anti Fc humano.

Los monocitos humanos se prepararon a partir de sangre entera humana de la siguiente manera: Se recolectaron 60-100 ml de sangre entera humana en tubos de 171 IU de heparina de litio de 10 ml BD Vacutainer. La sangre se dividió en 3-4 tubos Leucosep Ficoll (Greiner Bio-One) y se completó con PBS. Los tubos se centrifugaron a 1000g, 20°C durante 10 minutos sin freno, y se recogió la capa de PBMC. Las células se sedimentaron y los monocitos luego se aislaron utilizando perlas de CD14 humano de selección positiva (Miltenyi Biotec 130-050-201) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se reticuló el anticuerpo Ab969.g0 mediante la adición de anticuerpo Fc de cabra anti-IgG humana (R & D Systems G-102-C) en una proporción de 2:1 Ab969.g0:Fc. Los monocitos se sembraron a 20000 células por pocillo en medios en presencia de una titulación de la dosis de anticuerpo Ab969.g0 o Ab969.g0 reticulado (serie de diluciones media-log que comprende 16 concentraciones, máximo 10 µg/ml). Los pocillos de control no contenían anticuerpo, en presencia y ausencia de 100 ng/ml de CSF-1, y en presencia y ausencia de anticuerpo anti-Fc humano (en la misma concentración presente en la concentración máxima de anticuerpo Ab969.g0 (5 µg/ml)). Las células se incubaron durante 24 horas, las placas se centrifugaron para sedimentar las células, y se recogió el sobrenadante. El MCP-1 segregado se midió por MSD (K151AYB-2) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

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

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

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

i) Generación de injertos humanizados

Se humanizaron los anticuerpos 969 y 970 injertando las CDR de las regiones V de anticuerpo de rata en los marcos de la región V de anticuerpo de la línea germinal humana.

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

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

Se conservó un número de residuos de marco de las regiones V de rata en las secuencias humanizadas, como se muestra en la Tabla 1.

Los genes que codifican las secuencias de la región V de cadena pesada y ligera humanizadas iniciales, llamados gL1 y gH1, respectivamente, fueron diseñados y construidos mediante un enfoque de síntesis automatizada. Se crearon otras variantes de las regiones V de cadena pesada y ligera mediante la modificación de los genes gL1 y gH1 por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.

Los genes VK (gL1 a gL9) se donaron en el vector de expresión pKH10.1 de cadena ligera humana, que contiene ADN que codifica la región constante de la cadena Kappa humana (alotipo Km3). Los genes VH (gH1 y gH2) se donaron en el vector de expresión gamma-4 de cadena pesada humano pVhy4P FL, que contiene ADN que codifica la región constante humana gamma-4 de cadena pesada con la mutación estabilizadora de bisagra S241P (Angal *et al.*, 1993, Mol Immunol. 30:105-8). Las diferentes combinaciones de plásmidos que codifican las cadenas ligeras y pesadas variantes fueron co-transfectadas en HEK293F, lo que resulta en la expresión de los anticuerpos 969 humanizados, recombinantes.

Los otros tres anticuerpos anti-CSF-1R también fueron humanizados proporcionando un injerto conservador que contiene un número de residuos de donante en las cadenas pesadas y ligeras que se prevé son de importancia y un injerto totalmente humanizado que no contiene residuos de donante.

ii) *Afinidad de los anticuerpos humanizados*

Cada injerto humanizado se evaluó para determinar (i) la afinidad de unión a CSF-1R humano por BIAcore y (ii) la temperatura de fusión (T_m) medida mediante análisis de

ThermoFluor, ambas en relación con el anticuerpo quimérico parental. Se cree que la temperatura de fusión proporciona una indicación temprana de la estabilidad de una molécula de anticuerpo, exhibiendo los anticuerpos inestables típicamente una T_m inferior a 75,0°C.

Los injertos que representan las etapas de humanización del Ab969 se muestran en la **Tabla 5**. La Tabla 5 también muestra el anticuerpo quimérico del Ab696 (969cHcL). El injerto conservador (969gHlgL1) exhibió una constante de afinidad (K_D) de 2,4pM, de manera que no existió pérdida aparente de afinidad en comparación con el anticuerpo quimérico de rata (969cHcL). La T_m del injerto conservador 969gHlgL1 era 78,8°C y, por tanto, por encima de un valor umbral de 75,0°C. La sustitución del residuo de donante A78 por V78 en la cadena pesada para producir 969gH2gL1 no redujo la afinidad del anticuerpo ($K_D=2,3pM$). Tras la sustitución por etapas de residuos de donante K38, Y71 y F87, a Q38, F71 e Y87 respectivamente, no se observaron cambios en la afinidad. El injerto humanizado final 969gH2gL8 que no contiene residuos de donante exhibió una afinidad similar a la del anticuerpo quimérico parental (4,1pM).

Tabla 5

Injerto de anticuerpo	Residuos de donante VK	Residuos de donante VL	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969cHcL	N/A	N/A	2.31E+06	7.99E-06	3.5
969gH1gL1	K38, Y71, F87	A78	2.04E+06	5.00E-06	2.4
969gH1gL2	Y71, F87	A78	1.46E+06	5.00E-06	3.4
969gH1gL3	K38, F87	A78	1.80E+06	5.00E-06	2.8
969gH1gL4	K38, Y71	A78	2.39E+06	5.00E-06	2.1
969gH1gL5	F87	A78	9.26E+05	6.11E-06	6.6
969gH1gL6	K38	A78	1.15E+06	5.00E-06	4.4
969gH1gL7	Y71	A78	1.50E+06	5.00E-06	3.3
969gH1gL8	-	A78	1.17E+06	5.00E-06	4.3
969gH2gL1	K38, Y71, F87	-	2.27E+06	5.23E-06	2.3
969gH2gL2	Y71, F87	-	1.78E+06	6.11E-06	3.4
969gH2gL3	K38, F87	-	2.12E+06	7.29E-06	3.4
969gH2gL4	K38, Y71	-	2.20E+06	9.64E-06	4.4
969gH2gL5	F87	-	7.68E+05	5.00E-06	6.5
969gH2gL6	K38	-	1.40E+06	6.23E-06	4.4
969gH2gL7	Y71	-	1.40E+06	5.00E-06	3.6
969gH2gL8	-	-	1.23E+06	5.00E-06	4.1

Ab969 posee un motivo de isomerización DG potencial en la unión de CDR-L2 y el marco. Este residuo de ácido aspártico del sitio DG en los injertos 969gH2gL7 y 969gH2gL8 fue

mutado a sería para proporcionar una secuencia SG inerte. La afinidad hacia CSF-1R se midió mediante BIAcore y no se detectó ninguna pérdida aparente de afinidad (**Tabla 6**). Por otra parte, los injertos finales 969H2gL7 (SG) y 969gH2gL8 (SG) conservaron una T_m alta de 80,5°C y 79,9°C, respectivamente.

Tabla 6

Injerto de anticuerpo	Residuos de donante VK	Residuos de donante VH	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969cHcL	N/A	N/A	4.35E+06	8.53E-06	2.0
969gH2gL7 DG	Y71	-	2.56E+06	7.16E-06	2.8
969gH2gL7 SG	Y71	-	2.54E+06	5.00E-06	2.0
969gH2gL8 DG	-	-	2.18E+06	5.00E-06	2.3
969gH2gL8 SG	-	-	3.22E+06	5.00E-06	1.6

La humanización de Ab969 y de otro anticuerpo Ab970 anti-CSF-1R generó anticuerpos totalmente humanizados (sin residuos de donantes de rata presentes) con una afinidad (K_D) equivalente a la del anticuerpo quimérico parental y una T_m que dio una predicción inicial de estabilidad molecular. La versión completamente humanizada de Ab969 (969gH2gL8 SG)) se renombró Ab969.g5. A partir de aquí, la versión quimérica del Ab969 se denominará Ab969.g0.

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

Tabla 7

Anticuerpo	Experimento	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969.g0	1	2.16E+06	9.49E-06	4.4
	2	2.16E+06	9.10E-06	4.2
	Media	2.16E+06	9.30E-06	4.3
969.g5	1	1.63E+06	8.13E-06	5.0
	2	1.50E+06	7.96E-06	5.3
	Media	1.57E+06	8.05E-06	5.1

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

Se requiere CSF-1 para la activación y supervivencia de los monocitos en cultivo; si se retira el CSF-1, los monocitos sufren rápidamente apoptosis. Se ideó un ensayo que utiliza MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1; también conocida como CCL2, ligando 2 de quimiocina, motivo CC) como una lectura de salida. Tras la estimulación con CSF-1, los monocitos humanos segregan MCP-1, que puede detectarse en los sobrenadantes de células mediante un ELISA, típicamente 24 horas después de la estimulación. La inhibición de la señalización de CSF-1R por anticuerpos que bloquean la unión de CSF-1 causa una reducción en la secreción de MCP-1.

Se prepararon PBMCs humanas a partir de sangre entera humana fresca en un gradiente de Ficoll y se purificaron monocitos CD14⁺ mediante selección positiva. Se incubaron un total de 2×10^4 monocitos con una serie de diluciones media-log de 10 µg/ml a 0.35 µg/ml de anticuerpo en presencia de 100 ng/ml de CSF-1 humano durante 24 horas. Los controles, que comprendían “ausencia de anticuerpo, ausencia de CSF-1” y “ausencia de anticuerpo, con CSF-1”, se incluyeron para proporcionar valores de liberación de MCP-1 mínimos y máximos. Después de una incubación de 24 horas, las células se sedimentaron mediante centrifugación y el sobrenadante se recogió. La concentración de MCP-1 se midió usando el DuoSet ELISA CCL2/MCP-1 humano (R&D Systems DY279) siguiendo las instrucciones del fabricante.

De aquí en adelante al ensayo se lo denomina “ensayo de inhibición de MCP-1”.

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

Se realizó una serie de experimentos usando Ab969 con el fin de revelar por qué el anticuerpo humanizado presentó una actividad reducida en el ensayo de inhibición de MCP-1. Los datos sugirieron que la pérdida de actividad del Ab969.g5 observada en el ensayo de inhibición de MCP-1 fue debida al orden en el que se añadieron el anticuerpo y el ligando a las células diana. La actividad tanto del Ab969.g0 como del Ab969.g5 se redujo cuando se aplicó un

formato de ensayo competitivo, pero lo que es más importante, se detectó un diferencial más grande en su actividad de bloqueo. Para analizar si una constante de asociación menor del Ab969 humanizado pudo ser responsable de la reducción de potencia se realizó un análisis BIAcore. Estos datos han identificado que, mientras que la K_D del Ab969.g0 y el Ab969.g5 fueron similares, la K_a fue menor para el Ab969.g5, a $1,57 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ en comparación con $2,16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para 969.g0 (véase la **Tabla 5**). En un ensayo competitivo, donde CSF-1 y el anticuerpo anti-CSF-1R compiten por la unión al mismo receptor, una constante de asociación de anticuerpo más lenta podría resultar en una reducción de la actividad de bloqueo si la constante de asociación del ligando también es elevada y el ligando está presente en una concentración alta. Se sabe que el CSF-1 humano tiene una constante de asociación particularmente alta de $2.19 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, similar a los anticuerpos, y el ensayo se realizó con una concentración de CSF-1 alta (250 ng/ml).

Con el fin de proporcionar evidencia adicional de que la reducción en la actividad de bloqueo del 969.g5 se debía a una propiedad innata del anticuerpo, se desarrolló un ELISA que mide la unión de CSF-1 a CSF-1R. Este método se denomina de aquí en adelante “ensayo de bloqueo de ligando ELISA”. Este ensayo se realizó utilizando unión competitiva, donde el CSF-1 y el anticuerpo fueron pre-mezclados antes de la aplicación al CSF-1R unido a la placa. El ensayo también se llevó a cabo para evaluar la influencia de la concentración de CSF-1 sobre la actividad del anticuerpo.

Cuando el IC_{50} de 969.g0 y 969.g5 se midió en el ensayo de bloqueo de ligando ELISA utilizando una concentración de CSF-1 de 1 ng/ml, ambos anticuerpos parecieron tener una actividad similar con una IC_{50} de 12,83 ng/ml frente a 19,65 ng/ml respectivamente. Cuando se utilizó una concentración de 10 ng/ml de CSF-1 en el ensayo, la IC_{50} tanto del Ab969.g0 como del Ab969.g5 aumentó, pero lo que resulta más importante, el diferencial entre ellos aumentó aún más a 79,29 ng/ml frente a 268,10 ng/ml respectivamente. La tendencia continuó en un ensayo que utiliza 100 ng/ml de CSF-1, donde Ab969.g0 y Ab969.g5 dieron valores de IC_{50} de 828,70 ng/ml y 3947,00 ng/ml respectivamente. Un ensayo competitivo demuestra que Ab969.g5 es menos activo que Ab969.g0 en el bloqueo de la unión de CSF-1 a CSF-1R. Esta reducción de la potencia se hace más pronunciada a medida que la concentración de CSF-1 se incrementa.

- iv) *Identificación de los injertos humanizados de Ab 969 con actividad equivalente al Ab 969 quimérico en ensayo de inhibición de MCP-1*

Se preparó un panel de injertos intermedios humanizados de Ab969 mediante expresión transitoria de manera que pudo compararse la actividad *in vitro* (**Tabla 8**). El anticuerpo quimérico correspondiente (Ab969.g0) y el injerto totalmente humanizado (Ab969.g5) también se incluyeron en la expresión transitoria de modo tal que se pudo realizar una comparación directa de las características de los anticuerpos dentro del mismo lote.

Tabla 8:

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

La actividad *in vitro* de cada anticuerpo se ensayó en el ensayo de inhibición de MCP-1. Se eligió el formato de ensayo que utiliza una titulación de CSF-1 con una concentración única de anticuerpo, dado que el formato permite la detección rápida de un panel de anticuerpos grande y pone de relieve cualquier actividad de bloqueo de CSF-1R diferencial. En este ensayo, se detectó una liberación dependiente de la dosis de MCP-1 a partir de los monocitos humanos primarios y se midió la capacidad relativa de cada anticuerpo para bloquear la actividad de CSF-1R por la concentración de CSF-1 donde se liberó MCP-1. Los monocitos se sembraron a 20000 células por pocillo en medios en presencia de una titulación de CSF-1 humano recombinante (serie de dilución 2 veces que comprende 18 concentraciones, máximo 500 ng/ml). Se añadió una dosis única de 1 µg/ml de anticuerpo. Las células se incubaron durante 24 horas y el sobrenadante se recogió. Se midió el MCP-1 secretado mediante ELISA. El ensayo de inhibición de MCP-1 reveló que los anticuerpos Ab969.g2 y Ab969.g7 conservaron actividad de bloqueo de CSF-1R alta, siendo ambas entidades capaces de inhibir completamente la secreción de MCP-1 cuando se añadió CSF-1 a los monocitos a una concentración mayor de 100 ng/ml (**Figura 14**). En este ensayo, se detectó una clara pérdida de actividad para Ab969.g5, que solo pudo inhibir la secreción de MCP-1 hasta una concentración de CSF-1 de 10 ng/ml. De modo similar, el

anticuerpo Ab969.g9 exhibió reducción de la actividad de bloqueo de CSF-1R en comparación con Ab969.g2 y Ab969.g7.

Se midió la IC_{50} de injertos humanizados de Ab969 seleccionados en el ensayo de MCP-1 para proporcionar una evaluación más completa de su capacidad relativa para inhibir la activación de monocitos mediada por CSF-1. Se consideró importante evaluar la actividad del anticuerpo utilizando varios donantes diferentes, sin un agrupamiento de monocitos de fuentes mixtas. La **Tabla 9** muestra valores de IC_{50} de los anticuerpos acumulados a partir de ensayos realizados en Ab969 usando 6 donantes diferentes.

Tanto los injertos humanizados Ab969.g2 como Ab969.g7 presentan una IC_{50} relativa que es comparable con el anticuerpo quimérico Ab969.g0. En marcado contraste, Ab969.g5, exhibe mucha menos potencia en el ensayo (relación media de IC_{50} quimérico/injerto de 19,6).

Tabla 9:

Antic.	Res. don VK	Res. don VH	IC ₅₀ (ng/ml)								Media quimérico/injerto
			Don. 1	Don. 2	Don. 3	Don. 4	Don. 5	Don. 6	Media ± S.E		
969.g0	N/A	N/A	31.0	5.7	59.4	41.7	20.9	7.1	27.6 +/- 8.5	N/A	
969.g7	K38, Y7	-	46.3 (1.5)	6.1 (1.1)	N/A	N/A	N/A	N/A	26.2 +/- 14.2	1.3	
969.g2	Y71	-	N/A	N/A	80.6 (1.4)	42.2 (1.0)	22.3 (1.1)	14.4 (2.0)	39.9 +/- 14.8	1.3	
969.g5	-(SG)	-	667.1 (21.5)	100.3 (17.6)	N/A	N/A	N/A	N/A	383.7 +/- 200.4	19.6	

v) *Afinidad de/panel de anticuerpos Ab969 humanizados*

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

Tabla 10:

Inj. de anticuerpo	Nombre del	Residuos de donante	Residuos de donante	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
969cHcL	anticuerpo 969.0	VK N/A	VH N/A	2.83E+06	1.03E-05	3.6
				2.79E+06	1.10E-05	3.9
				2.68E+06	9.51E-06	3.6
				2.77E+06	1.03E-05	3.7
969gH1gL1	969.g1	K38, Y71, F87	A78	2.65E+06	8.47E-06	3.2
				2.57E+06	6.04E-06	2.4
				2.51E+06	9.88E-06	3.9
				2.58E+06	8.13E-06	3.2
969gH2gL1	969.g6	K38, Y71, F87	-	2.43E+06	8.84E-06	3.6
				2.44E+06	8.95E-06	3.7
				2.54E+06	6.63E-06	2.6
				2.47E+06	8.14E-06	3.3
969gH2gL4	969.g7	K38, Y71	-	2.57E+06	7.73E-06	3.0
				2.60E+06	9.41E-06	3.6
				2.52E+06	1.15E-05	4.6
				2.56E+06	9.55E-06	3.7
969gH2gL7	969.g2	Y71	-	2.46E+06	1.07E-05	4.3
				2.49E+06	8.39E-06	3.4
				2.44E+06	8.74E-06	3.6
				2.46E+06	9.28E-06	3.8
969gH2gL8	969.g4	-	-	1.99E+06	5.00E-06	2.5
				1.94E+06	6.65E-06	3.4
				1.97E+06	5.00E-06	2.5
				1.97E+06	5.55E-06	2.8
969gH2gL8(SG)	969.g5	-	-	1.71E+06	5.00E-06	2.9
				1.85E+06	7.03E-06	3.8
				1.84E+06	6.76E-06	3.7
				1.80E+06	6.26E-06	3.5

Conclusiones:

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

Ejemplo 4 - Estabilidad molecular de panel de Ab696 humanizado

i) Estabilidad térmica

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

La T_m medida por Thermofluor para diversos injertos de anticuerpo 969 (en PBS, pH7,4) se resume en la Tabla 11.

Tabla 11

Muestra	Media T_m1 (°C)	S.D. T_m1 (°C)	Media T_m2 (°C)	S.D. T_m2 (°C)
969.g2	80.5	0.6	65.6	0.4
969.g2	80.5	0.6	65.6	0.4
969.g5	79.7	0.6	64.7	0.2
969.g5 (pH 5.0)	82.7	0.1	59.9	0.5
969.g7	79.8	0.5	65.9	0.4
969.g9	79.4	0.5	65.8	0.5
Control de IgG4	66.4	0.8	ND	ND

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

ii) *El efecto de la concentración de la muestra sobre la propensión de agregación*

Como un factor de predicción de la estabilidad de las muestras durante el almacenamiento, se estudió el efecto de la concentración de anticuerpo sobre la estabilidad en PBS pH 7.4.

Experimento 1:

Los anticuerpos se concentraron a >10 mg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 días. Inmediatamente después de la concentración (T_0) el 969.g7 pareció turbio y el 969.g8 pareció ligeramente opalescente. En contraste, se estimó mediante inspección visual que la muestra de 969.g5 era clara. Después de 5 días de incubación a temperatura ambiente, la muestra de 965.g5 permaneció clara, mientras que la agregación de 969.g7 y 969.g8 había mostrado mayor progreso, exhibiendo cada una un precipitado pesado.

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

Experimento 2:

Antes de la concentración, las tres muestras de anticuerpo eran claras a la inspección visual, con la excepción de 969.g6 (a 4,68 mg/ml) que lució opalescente. Tras la concentración a 16 mg/ml, se observó precipitación de 969.g6 después de 24 horas de almacenamiento tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Sin embargo, tanto 969.g1 como 969.g4 permanecieron visiblemente claros. Después de 5 días de incubación adicional, las partículas grandes fueron evidentes para la muestra de 969.g1 tanto a temperatura ambiente como a 4°C. No se observó

agregación para la muestra de 969.g4 ya fuera a temperatura ambiente o a 4°C, a juzgar por la inspección visual.

De este estudio se pudo demostrar que el 969.g6 tenía cierta inestabilidad de agregación cuando se almacenaba a baja concentración (4,68 mg/ml) en PBS pH 7.4. Por otra parte, esta precipitación se vio agravada por una mayor concentración de anticuerpos. El 969.g1 concentrado mostró una menor tasa de agregación, mientras que el 969.g4 concentrado se mantuvo estable hasta 5 días en cualquiera de las temperaturas de almacenamiento. El orden de estabilidad a la agregación era por lo tanto: 969.g4 > 969.g1 > 969.g6.

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

Se realizó un análisis sobre las muestras inmediatamente después de la concentración (T_0), después de una incubación durante la noche y 5 días después de la concentración. Todas las muestras se vieron claras en la inspección visual antes de la concentración y no hubo evidencia de formación de partículas. Inmediatamente después de la concentración a 23,07 mg/ml, la muestra de 969.g7 mostró precipitación como se había observado previamente en el experimento 1. Hubo una ligera opalescencia observada en el 969.g9, que se hizo más notable después de 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente o a 4°C. Todos los otros injertos de 969 se mostraron claros a la inspección visual inmediatamente después de la concentración.

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

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

Conclusión: Durante la expresión y la purificación del panel de Ab969 humanizado, se hizo evidente que el aumento de la concentración de anticuerpo por encima de 10 mg/ml dio lugar a una rápida precipitación de algunos injertos de anticuerpos humanizados. Específicamente, Ab969.g1, Ab969.g6 y Ab969.g7 formaron precipitado, mientras que Ab969.g2, Ab969.g4 y Ab969.g5 no lo hicieron. Estos datos indican que una sustitución del residuo de lisina en la posición 38 (K38) dentro de la cadena ligera para glutamina mejora la estabilidad de los anticuerpos cuando se concentra por encima de 10 mg/ml.

Ejemplo 5 Análisis *In vitro* del Ab969.g2

i) Secuencia del Ab969.g2

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

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

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

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

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

Se sembraron monocitos humanos primarios a razón de 20000 células por pocillo en presencia de 100 ng/ml de IL-34 humana recombinante y una titulación de dosis de anticuerpo anti-CSF-1R (serie de diluciones media-log que comprende 16 concentraciones, máximo 10 µg/ml). Las células se incubaron durante 24 horas y el sobrenadante se recogió. Se midió el MCP-1 secretado mediante ELISA (R&D systems DY279). El gráfico muestra el porcentaje de inhibición de la producción de MCP-1 en comparación con el control que solo contenía CSF-1.

Tabla 12

Anticuerpo	IC ₅₀ (ng/ml)		
	Donante 1	Donante 2	Media $\pm$ S.E.
969.g0	20.10	9.79	14.95 $\pm$ 5.17
969.g2	20.58	9.59	15.09 $\pm$ 5.51

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

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

Ejemplo 6 Análisis de marcador farmacodinámico en mono *cynomolgus*

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

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

$t_{1/2}$ es la semivida del anticuerpo en el suero.

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

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

Depuración es el volumen de plasma depurado de fármaco por unidad de tiempo.

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

Hubo una buena correlación entre los valores observados y predichos (el animal 2 fue una excepción y se consideró como un valor atípico). La C_{max} fue proporcional a la dosis; el área bajo la curva (AUC) fue mayor que proporcional a la dosis, lo que indica una depuración más lenta a la dosis más alta. La mayoría del 969.g2 se detectó en el suero.

Tabla 13

Animal	Dosis [mg/ kg]	t _{1/2} [h]	C _{max} [µg/ mL]	AUC _{INF_obs} [h* µg/ mL]	Depuración (Cl _{obs}) [mL/ h/ kg]	Distribución de Vol. (V _{z_obs}) [mL/ kg]
1	7	66.1	209.4	23184.5	0.30	28.8
2	7	30.3	117.6	6075.9	1.15	50.4
3	7	63.3	188.7	16761.0	0.42	38.1
4	1.5	27.9	36.1	1928.1	0.78	31.3
5	1.5	22.7	34.7	1668.6	0.90	29.5
6	1.5	27.1	36.6	1634.8	0.92	35.9

La principal vía de depuración de CSF-1 es a través de la unión a su receptor afín, CSF-1R. Se espera que el bloqueo de unión de CSF-1 a CSF-1R aumente la concentración sérica de CSF-1, mediante el impedimento de la depuración mediada por el receptor; un fenómeno que se ha observado en modelos murinos. Por lo tanto, un aumento en la concentración de CSF-1 en suero es un marcador farmacodinámico de la activación y la inhibición de CSF-1R.

Ambas dosis de 969.g2 instigaron una acumulación rápida y significativa de CSF-1 en suero. El efecto fue dependiente de la dosis, dando la dosis de 7 mg/kg una concentración de CSF-1 máxima aproximadamente 10 veces más alta que la dosis de 1.5 mg/kg. Se observó una relación farmacocinética/farmacodinámica con normalización de niveles de CSF-1 tras la depuración del anticuerpo. Los niveles de CSF-1 volvieron a los valores iniciales para el final del estudio en el caso de ambos grupos de tratamiento. Los resultados se muestran en las **Figuras 15a y 15b**.

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

Figura 15b muestra la concentración de CSF-1 en muestras de suero tomadas de monos *cynomolgus* tratados con una dosis intravenosa única de 1,5 mg/kg de Ab969.g2. La concentración sérica de CSF-1 se midió en dos ensayos independientes. El gráfico muestra la concentración media de CSF-1 para los tres animales en el Grupo 2 (1,5 mg/kg) con un error estándar (cuadrados). También se muestra la concentración sérica media de Ab969.g2 (círculos).

Hay dos grandes poblaciones de monocitos humanos y de monos *cynomolgus* circulantes; (i) monocitos “clásicos” CD14⁺ CD16⁻ y (ii) monocitos “residentes” o “no clásicos” CD14⁺ CD16⁺. Los modelos murinos han demostrado que los macrófagos tisulares residentes, incluyendo TAM, se derivan de la población de monocitos no clásica. Además, los monocitos no clásicos se derivan de una mayor diferenciación de la población de monocitos clásica. Las poblaciones de monocitos circulantes en monos *cynomolgus* que recibieron dosis de 969.g2 fueron supervisadas por citometría de flujo de cuatro colores de la sangre entera. Se realizó citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD45-PerCP de *cynomolgus*, anti-HLA-DR-APC humano, anti-CD14-FITC humano (clon My4) y anti-CD16-PE humano (clon 3G8). Se establecieron puertas utilizando el control de isotipo apropiado para cada anticuerpo. Los monocitos clásicos se definieron como CD45⁺ HLA-DR⁺ CD14⁺ CD16⁻. Los monocitos no clásicos se definieron como CD45⁺ HLA-DR⁺ CD14⁺ CD16⁺.

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

En este ejemplo se confirmó que (i) el anticuerpo 969.g2 fue capaz de unirse a CSF-1R y bloquear la unión de CSF-1 en el mono *cynomolgus*, (i) demostró actividad farmacológica del anticuerpo 969.g2 en un modelo de primate no humano, (iii) demostró que el anticuerpo 969.g2 agotó selectivamente la población no clásica de los monocitos de mono *cynomolgus in vivo* - la población de monocitos que se cree son precursores de macrófagos asociados a tumores, y (iv) que la concentración de CSF-1 en suero era adecuada como un biomarcador para la medición de la actividad de 969.g2.

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

El anticuerpo 969.g2 no es capaz de unirse a CSF-1R de ratón. De manera acorde, se llevaron a cabo estudios *in vivo* en ratones utilizando un anticuerpo anti-CSF-1R murino Ab535

para mostrar la utilidad del Ab969.g2 para tratar el cáncer y la fibrosis. Se ha demostrado que el Ab535 tiene propiedades y actividad comparables al Ab969.g2 en una serie de experimentos *in vitro*.

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

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

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

Los resultados se muestran en la **Figura 16**. El Ab535 mostró un efecto antitumoral dependiente de la dosis. Ambas dosis del anticuerpo IgG de ratón de control no indujeron una inhibición del crecimiento tumoral. Los volúmenes tumorales relativos fueron comparables con el control de vehículo y el control positivo provocó inhibición del crecimiento tumoral.

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

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

La eficacia antitumoral y antimetastásica del anticuerpo Ab535 también se ensayó usando un modelo de cáncer de próstata ortotópico PC-3 *in vivo*. La línea celular PC-3 se alteró genéticamente para expresar continuamente luciferasa permitiendo un análisis de imágenes de bioluminiscencia *in vivo*, lo que permitió monitorear el crecimiento tumoral *in vivo* y realizar un análisis de metástasis *ex vivo* en órganos seleccionados.

El estudio consistió en 6 grupos experimentales, cada uno de los cuales contenía ya sea 11 (Grupo 5) o 12 (todos los demás Grupos) ratones rasurados NMR1 machos después de la aleatorización. En el día 0, se implantaron ortotópicamente células PC-3 en la próstata de todos los ratones rasurados NMRI macho participantes. El día 3, se verificó el inicio del crecimiento tumoral mediante imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. El día 8 se realizó un segundo estudio mediante imagen de bioluminiscencia *in vivo* y se asignaron al azar animales con tumores a seis grupos de acuerdo con los resultados de los estudios mediante imagen, de tal manera que la intensidad media de la bioluminiscencia y, por tanto, el tamaño del tumor fueron similares en cada Grupo. Al día siguiente (día 9), se inició la terapia. Los animales de los Grupos 2 y 3 recibieron 30 y 10 mg/kg de Anticuerpo de Control, respectivamente, 3 veces por semana por vía subcutánea hasta el día 42. Los animales de los Grupos de Tratamiento 4 y 5 recibieron 30 y 10 mg/kg de anticuerpo Ab535, respectivamente, 3 veces por semana por vía subcutánea hasta el día 42. Los animales del Grupo 1 representaron el Control del Vehículo y recibieron Vehículo (PBS) 3 veces por semana por vía subcutánea hasta el día 42. Los animales del Grupo 6 representaron el Control Positivo y recibieron 360 mg/kg de control por vía intravenosa una vez por semana durante cuatro semanas (en los días 10, 17, 24 y 31). Durante el curso del estudio, el crecimiento de los tumores PC-3 ortotópicamente implantados se monitoreó *in vivo* en los días 3, 8 (aleatorización), 15, 22, 29, 36 y 43 utilizando estudios de imagen de bioluminiscencia.

Se realizó una necropsia al final del estudio. Se determinaron el peso y el volumen del tumor primario. Se recogieron órganos seleccionados (hígado, bazo y pulmón), se fijó una porción de cada uno en formalina y el resto se analizó en relación con el patrón de metástasis mediante estudios de imagen de bioluminiscencia utilizando un ensayo de luciferasa *in vitro*.

Adicionalmente, se recogieron el fémur de una pierna y la misma porción de la columna lumbar para el análisis del patrón de metástasis en los huesos utilizando el ensayo de luciferasa *in vitro*.

El serial de bioluminiscencia *in vivo* estaba compuesto tanto del tumor primario como de las metástasis (estudio de imagen de todo el cuerpo). En base a estos datos, se pudo calcular una curva de crecimiento tumoral para todos los grupos (**Figura 17**). El desarrollo tumoral fue homogéneo dentro de todos los grupos de estudio, hasta la aleatorización y el inicio de la terapia. En los siguientes, tanto el Grupo 1 tratado con Control de Vehículo como los dos Grupos 2 y 3 tratados con Anticuerpo de Control RTE11 mostraron un crecimiento tumoral regular. Se observó una reducción altamente significativa del crecimiento tumoral medido *in vivo* en el día 43 en el caso del control positivo (Grupo 6). El anticuerpo Ab535, administrado a 30 o 10 mg/kg, respectivamente (Grupos 4 y 5), llevó a una reducción significativa del crecimiento tumoral cuando se monitoreó utilizando estudios de imagen de bioluminiscencia *in vivo*.

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

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

Se analizaron varios órganos adicionales (hígado, bazo, pulmón, fémur y una parte de la columna lumbar) utilizando la técnica de imagen de bioluminiscencia *ex vivo*. En el caso del control positivo, pudieron demostrarse reducciones significativas de la actividad de la luciferasa

para fémur y columna lumbar, mientras que la reducción del serial fue apenas por debajo del nivel significativo en el caso del hígado y el bazo. En el caso del Anticuerpo Ab535, administrado a 30 mg/kg (Grupo 4), la reducción de la actividad de la luciferasa fue significativa para el hígado y notable para todos los demás órganos. El Anticuerpo de Control (Grupos 2 y 3) no dio lugar a ninguna reducción de la actividad de luciferasa en todos los órganos analizados.

En conclusión, se pudo demostrar una eficacia antitumoral significativa para el anticuerpo Ab535 en este modelo de tumor, combinada con una eficacia antimetastásica notable.

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

La bleomicina es un antibiótico aislado primeramente a partir de *Streptomyces verticillatus* y se ha utilizado como un agente quimioterapéutico para varios tipos de cáncer. El modelo de fibrosis pulmonar con bleomicina es un modelo bien establecido y se utilizó esencialmente como se describe en Madtes, DK *et al*, 1999, Am J Respir Cell Mol Biol., 20, 924-34. El protocolo detallado se puede encontrar en la siguiente referencia Morschl, E., Molina, J.G., Volmer, J., Mohsenin, A., Pero, R.S., Hong, J.S., Kheradmand, F., Lee, J.J. y Blackburn, M.R. (2008), la señalización del receptor de adenosina A3 influye la inflamación y la fibrosis pulmonar. Am. J. Respir. Cell Mol. Bio1.39: 697-705.

Todos los ratones utilizados fueron ratones hembra C57B1k6 de tipo silvestre (20g) adquiridos de Harlan Labs. Se utilizó una instilación intratraqueal (IT) cortada donde los ratones fueron anestesiados con Avertin y se les realizó una traqueotomía con el fin de infundir una dosis de 3,5 unidades de bleomicina en 50 µl de solución salina o 50 µl de solución salina sola como control. El tratamiento según esta modalidad conduce a una fase inflamatoria que alcanza el máximo en el día 7 después de la exposición a la bleomicina y una fase fibrótica que alcanza el máximo en el día 21 posterior a la exposición. Se investigó el efecto del anticuerpo Ab535 en donde el anticuerpo se dosificó únicamente en la fase fibrótica del modelo y se administró por vía subcutánea a 30 mg/kg, tres veces por semana a partir del día 9-21. Los animales fueron sacrificados en el día 21 y las lecturas incluyeron análisis histopatológico de los pulmones, celularidad del líquido de BAL (lavado broncoalveolar) y la medición de colágeno soluble en el líquido de BAL. Se realizó un análisis histopatológico para puntuar el daño pulmonar usando un sistema de puntuación Ashcroft modificado para determinar la gravedad de la fibrosis pulmonar (Hubner RH *et al*, 2008, Biotechniques 44: 507-17). Los pulmones extirpados se inflaron con

10% de formalina a 25 cm de presión y se procesaron a través de una serie de alcoholes y xileno, se incluyeron en parafina y se desparafinaron las secciones de tejido antes del procesamiento y tinción con tinción tricrómica de Masson.

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

El efecto sobre la población de macrófagos en el líquido de BAL se determinó usando preparaciones de citospina. Las alícuotas de células BAL se hilaron en portaobjetos de microscopio, se tiñeron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

Se determinó que el tratamiento terapéutico con el anticuerpo anti-CSF-1R, Ab535, con la dosificación iniciada en el día 9, tuvo como resultado una gran reducción de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Tanto la gravedad como la extensión de la fibrosis se redujeron significativamente. Los ratones tratados habían reducido la producción de colágeno, mejorado la patología fibrótica y mejorado la protección de la barrera pulmonar.

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

La **Figura 18b** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, mostrando de este modo que los ratones tratados con Ab535 habían mejorado la patología fibrótica.

La **Figura 18c** muestra que el tratamiento de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina con Ab535 redujo la concentración de albúmina en el suero en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, mostrando de este modo una mejora en la permeabilidad vascular de los ratones tratados con Ab535.

La **figura 19** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de pulmones de animales tratados con control de solución salina, bleomicina más control de isotipo y bleomicina más Ab535. Los animales tratados con Ab535 presentaban una gran reducción de la fibrosis de los pulmones en comparación con los animales tratados con el control de isotipo y con bleomicina.

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

La adenosina es un nucleósido de señalización potente, cuyos niveles aumentan cuando las células sufren estrés o se ven dañadas y se produce una amplia variedad de respuestas cuando la adenosina se acopla con sus receptores específicos acoplados a proteína G. La adenosina desaminasa (ADA) es una enzima de catabolismo de purinas que convierte adenosina a inosina. Se generaron ratones knockout ADA y se demostró que presentaban niveles incrementados de adenosina en el suero, así como en tejidos tales como el riñón, hígado y pulmón (Blackburn, MR *et al*, 1998, J. Biol. Chem, 273 (9): 5093-5100). Estos ratones muestran características de enfermedad pulmonar crónica tales como destrucción alveolar, inflamación de las vías respiratorias y producción excesiva de moco que se asocian con un aumento de los niveles de adenosina en el pulmón (Blackburn MR *et al*, 2000, J. Exp. Med., 192: 159-70). Los efectos son tales que los ratones mueren a las tres semanas de edad, debido a la dificultad respiratoria. La administración de ADA exógena usando un régimen de dosis baja reduce los niveles de adenosina y extiende el tiempo de vida de estos ratones permitiendo el desarrollo de un modelo de fibrosis pulmonar (Chunn JL *et al*, 2005, J Immunol 175: 1937-1946, Pedrosa M *et al*, 2011, PLoS One, 6 (7): e22667). En este modelo, la elevación crónica de los niveles de adenosina se asocia con un aumento de mediadores pro-fibróticos incluyendo TGF β -1 en los pulmones, un aumento de la deposición de colágeno en el tejido pulmonar y un aumento de la patología pulmonar fibrótica. Para investigar el efecto de las moléculas con potencial anti-fibrótico, los ratones con deficiencia de ADA se mantienen en un régimen de ADA exógena a baja dosis durante varias semanas, el tratamiento con ADA luego se detiene y se administra el agente anti-fibrótico potencial.

El efecto del anticuerpo anti-CSF-1R Ab535 se investigó en el modelo de fibrosis pulmonar de ratón knockout ADA. En este modelo, los ratones deficientes en enzimas se mantuvieron en terapia con enzimas ADA del día 1 al día 21 después del parto. Se preparó un conjugado ADA-poli(etilenglicol) (PEG) (Young HW *et al*, 2004, J Immunol 173: 1380-1389) y se administraron inyecciones intramusculares en los días postnatales 1, 5, 9, 13 y 17 (0,625, 1,25, 2,5, 2,5 y 2,5 unidades, respectivamente), seguido por 5 unidades inyectadas por vía intraperitoneal en el día 21. No se administró más enzima después del día 21. Se dosificó Ab535

por vía subcutánea a 30 mg/kg, en un volumen de 100 µl tres veces/semana a partir del día 25 (post-parto) hasta que los animales se sacrificaron el día 42.

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

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

El efecto sobre la población de macrófagos en el líquido de BAL se determinó usando preparaciones de citospina. Las alícuotas de células BAL se hilaron en portaobjetos de microscopio, se tiñeron con Diff-Quick y se contaron los macrófagos.

Se determinó que el tratamiento terapéutico con anticuerpo anti-CSF-1R Ab535 redujo significativamente la fibrosis pulmonar en ratones deficientes en ADA. Los ratones tratados habían reducido la producción de colágeno, mejorado la patología fibrótica y mejorado la función y protección de la barrera pulmonar.

La **Figura 20a** muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida utilizando Ab535 redujo la concentración de colágeno BALF en comparación con el tratamiento con el control de isotipo.

La **Figura 20b** muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida utilizando Ab535 redujo la puntuación de Ashcroft de las muestras en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, mostrando de este modo que los ratones tratados con Ab535 habían mejorado la patología fibrótica.

La **Figura 20c** muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida utilizando Ab535 redujo la concentración de albúmina en el suero en comparación con el tratamiento con el control de isotipo, mostrando de este modo una mejora en la permeabilidad vascular de los ratones tratados con Ab535.

La **figura 20d** muestra que el tratamiento de ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida que recibieron Ab535 había reducido los números de macrófagos en el líquido de BAL.

La **figura 21** muestra imágenes representativas del análisis histopatológico de los pulmones de ratones normales (ADA^+) y ratones deficientes en ADA con fibrosis pulmonar inducida (ADA^-), ambos tratados con control de isotipo o Ab535. En ratones ADA^- , los animales tratados con Ab535 presentaron una gran reducción de la fibrosis de los pulmones en comparación con el control de isotipo.

De manera acorde, se ha demostrado en dos modelos de fibrosis pulmonar de ratón que el tratamiento con un anticuerpo anti-CSF-1R puede tratar eficazmente la enfermedad fibrótica.

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo anti-CSF-1R que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.
2. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:4 para CDR-H1, la secuencia incluida en SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y la secuencia incluida en SEQ ID NO:6 para CDR-H3.
3. Un anticuerpo anti-CSF-1R, que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3.
4. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que adicionalmente comprende una cadena ligera, donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia incluida en SEQ ID NO: 3 para CDR-L3.
5. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:1 para CDR-L1, la secuencia incluida en SEQ ID NO:2 para CDR-L2 y la secuencia incluida en SEQ ID NO:3 para CDR-L3.
6. Un anticuerpo anti-CSF-1R, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDR y la secuencia de CDR-H1 tiene al menos 60% de identidad o similitud con

la secuencia incluida en SEQ ID NO:4, la secuencia de CDR-H2 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia incluida en SEQ ID NO:5 y la secuencia de CDR-H3 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia incluida en SEQ ID NO:6.

7. Un anticuerpo anti-CSF-1R, de acuerdo con la reivindicación 6, que adicionalmente comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDR y la secuencia de CDR-L1 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia incluida en SEQ ID NO:1, la secuencia de CDR-L2 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia incluida en SEQ ID NO:2 y la secuencia de CDR-L3 tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia incluida en SEQ ID NO:3.

8. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cadena pesada comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:23.

9. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cadena ligera comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:15.

10. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de la misma, por ejemplo seleccionado del grupo que comprende un fragmento Fab, Fab' modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, VH, VL y scFv.

11. Un anticuerpo anti-CSF-1R, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:23 y una cadena ligera que comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:15.

12. Un anticuerpo anti-CSF-1R, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad o similitud con el dominio variable de la

cadena ligera del anticuerpo de la reivindicación 11 y en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad o similitud con el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de la reivindicación 11.

13. Un anticuerpo anti-CSF-1R, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:27 y una cadena ligera que comprende la secuencia incluida en SEQ ID NO:19.

14. Un anticuerpo anti-CSF-1R, en el que las cadenas pesadas y ligeras son al menos 80% idénticas o similares a las correspondientes cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de la reivindicación 13.

15. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que tiene una molécula efectora o indicadora unida a él.

16. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que tiene una afinidad de unión para CSF-1R humano de 10pM o menos de 10pM.

17. Un anticuerpo anti-CSF-1R que bloquea en forma cruzada la unión de un anticuerpo que comprende las 6 CDR incluidas en la secuencia SEQ ID NO:1 para CDR-L1, SEQ ID NO:2 para CDR-L2, SEQ ID NO:3 para CDR-L3, SEQ ID NO:4 para CDR-H1, SEQ ID NO:5 para CDR-H2 y SEQ ID NO:6 para CDR-H3, por ejemplo con una afinidad de 100pM o menos.

18. Un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el anticuerpo bloquea en forma cruzada la unión uniéndose al mismo epítipo que el anticuerpo que bloquea.

19. Una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y/o ligera(s) de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

20. Un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de acuerdo con la reivindicación 19.
21. Un vector de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el vector comprende las secuencias incluidas en las SEQ ID NO:28 y/o SEQ ID NO:20.
22. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la reivindicación 21.
23. Un proceso para la producción del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 22 y aislar el anticuerpo.
24. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
25. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.
26. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 para su uso como un medicamento.
27. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 para el tratamiento del cáncer.
28. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 para el tratamiento de la enfermedad fibrótica.

29. El uso de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del cáncer.

30. El uso de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad fibrótica.

31. Un método para el tratamiento de un sujeto humano que padece o está en riesgo de padecer cáncer, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25.

32. Un método para el tratamiento de un sujeto humano que padece o está en riesgo de padecer enfermedad fibrótica, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o una composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25.

33. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 27, uso de acuerdo con la reivindicación 29 o el método de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer colorrectal, leucemia, linfoma, cáncer de piel, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer astrocítico, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas y cáncer de ovario.

34. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 28, uso de acuerdo con la reivindicación 30 o el método de acuerdo con la reivindicación 32, en donde la enfermedad fibrótica se selecciona del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, tal como fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística, fibrosis renal, cirrosis hepática, fibrosis endomiocárdica, fibrosis

mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, infarto de miocardio, esclerodermia y artrofibrosis.

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

UCB BIOPHARMA SPRL

domiciliado (s) 60 Allée de la Recherche, B-1070 Brussels,
en/of Belgium

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial e Intelectual, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial and Intellectual Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed

autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

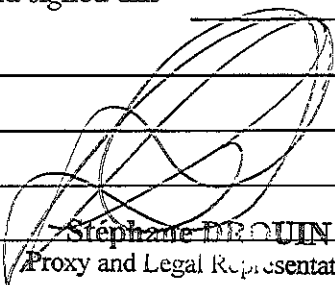
thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/ Given and signed this

En/in

Por/by

Firma/Signature


Stéphane DEQUIN
Proxy and Legal Representative

CAVELIER

ABOGADOS

Señor Director

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E.

S.

D.

Asunto :Solicitud de patente para ANTICUERPOS
PCT/EP2014/068050

Solicitante :UCB BIOPHARMA SPRL

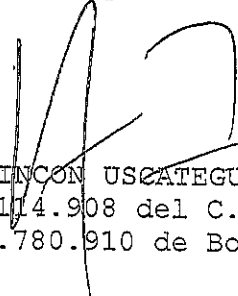
Yo, ADRIANA ZAPATA GIRALDO mayor de edad, vecina de esta ciudad, identificada con cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, en mi calidad de representante legal de la sociedad CAVELIER ABOGADOS domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, en desarrollo de la representación que le fue otorgada por UCB BIOPHARMA SPRL, confiero poder a los doctores ANDRES RINCON USCATEGUI, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.780.910 de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 114.908, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén, portadora de la Tarjeta Profesional No. 23.555, JORGE CHÁVARRO ARISTIÁBAL, identificado con la cédula de ciudadanía No. 16.209.380 de Cartago (Valle), portador de la Tarjeta Profesional No. 40.119 y EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY identificada con la cédula de ciudadanía No. 52.006.265 de Bogotá, portadora de la Tarjeta Profesional No. 65.794, para presentar la solicitud de registro de la patente indicada en la referencia.

Los apoderados quedan facultados para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Señor Director,


ADRIANA ZAPATA GIRALDO
C.C. No. 51.680.061 de Bogotá

Acepto:


ANDRES RINCON USCATEGUI
T.P.A. No. 114.908 del C.S.J.
C.C. No. 79.780.910 de Bogotá

MMS\SDC\COLO-22392-841-003-2

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel: (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 520 4760 / (57-4) 326 0789 / (57) 317 365 8663 / (57) 318 532 2365- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> ANTICUERPOS

<130> G0181-PCT

<150> GB1315487.7

<151> 2013-08-30

<160> 39

<170> Patentín versión 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencias CDR-L1 Ab CA019_969

<400> 1

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

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia CDRL2 Ab CA019_969

<400> 2

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias CDR-L3 Ab CA019_969

<400> 3

Leu Gln Asp Ser Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencias CDR-H1 Ab CA019_969

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencias CDR-H2 Ab CA019_969

<400> 5

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

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencias CDR-H3 Ab CA019_969

<400> 6

Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región VL Ab969 de rata

<400> 7

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 8
<211> 321
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región VL Ab969 de rata

<400> 8
gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtctcc 60

atcgaatgtc tagcaagtga ggacatttac gataatttag cgtggtacca gaagaagcca 120

ggaaaatctc ctcacctctc catctattat gcaagtagct tgcaagatgg ggtcccatca 180

cggttcagtg gcagtggatc tggcacacag tattctctca aaatcaacag cctggaatct 240

gaagatgctg cgacttattt ctgtctacag gattctgagt atccgtggac gtcggtgga 300

ggcaccaagc tggaattgaa a 321

<210> 9
<211> 127
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región VL Ab969 de rata con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 9

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Val Leu Leu Leu Trp Ile Thr

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región VH Ab969 de rata

<400> 11

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

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

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

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

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

Phe Leu Lys Leu Thr Asn Val His Thr Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

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

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

<210> 12
<211> 375
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región VH Ab969 de rata

<400> 12

caggttactc tgaagagtc tggcctggg atattgcagc cctccagac cctcagtctg 60

acttgcactt tctctgggtt ttactgacc acctatggta tgggtgtggg ctggattcgt 120

cagccttcag ggaaggggtct ggagtggctg gcaaacattt ggtgggatga tgataagtat 180

tacaatccat ctctgaaaaa ccggtcaca atctccaagg acacctcaa caaccaagca 240

ttcctcaagc tcaccaatgt acacacttca gattctgcca catactactg tgctcggata 300

gggccgatta aatacccgac ggccccctac cggctacttg acttctgggg cccaggaacc 360

atgggtcaccg tctcg 375

<210> 13
<211> 144
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región VH Ab969 de rata con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 432
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región VH Ab969 de rata con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 14
atggacaggc ttacttctc attctactg ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtctcag 60
gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 120
tgcactttct ctgggttttc actgaccact tatggtatgg gtgtgggctg gattcgtcag 180
ccttcaggga agggctctga gtggctggca aacatttggg gggatgatga taagtattac 240
aatccatctc tgaaaaaccg gtcacaatc tccaaggaca cctccaacaa ccaagcattc 300
ctcaagctca ccaatgtaca cacttcagat tctgccacat actactgtgc tcggataggg 360
ccgattaaat acccgacggc cccctaccgg tactttgact tctggggccc aggaaccatg 420
gtcaccgtct cg 432

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

<220>
<223> Región V 969 gL7

<400> 15

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 Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 16
<211> 321
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región V 969 gL7

<400> 16
gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga cagggtgaca 60
atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 120
ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 180
cgggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 240
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 300
ggcaccaaag tggaaatcaa g 321

<210> 17
<211> 127
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región V 969 gL7 con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 381
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región V 969 gL7 con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 18
atgagcgtgc ctactcaagt ctgggggctg ctcttgcttt ggcttaccga cgcaagatgc 60

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtgggaga cagggtgaca 120

atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 180

ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 240

cgggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 300

gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac ctcggtggt 360

ggcaccaaag tggaaatcaa g 381

<210> 19
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera 969 gL7 (V + constante)

<400> 19

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

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

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

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 20

<211> 642

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 20

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcca gtgtggggaga cagggtgaca 60

atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 120

ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 180

cgggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 240

gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 300

ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcc 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 21

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera 969 gL7 (V + constante) con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 21

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp

35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser

100 105 110

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

115	120	125	
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
130	135	140	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
145	150	155	160
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
165	170	175	
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
180	185	190	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			
195	200	205	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
210	215	220	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230		

<210> 22
<211> 702
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera 969 gL7 (V + constante) con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 22
atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga cgcaagatgc 60
gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtggggaga cagggtgaca 120
atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 180
ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 240
cgggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 300
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 360
ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtggtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac agggggagagt gt 702

<210> 23

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región V 969 gH2

<400> 23

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr

100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

115 120 125

<210> 24

<211> 375

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región V 969 gH2

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

<210> 26
<211> 432
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región V 969 gH2 con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 26
atggagtggt cctgggtgtt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggt ccactccgaa 60
gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa ccaaact cactttgaca 120
tgtactttta gtggcttctc attgactacc tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag 180
ccacctggca aggctctgga atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat 240
aaccctgcc tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggtg 300
ctgaccatga caaatatgga tcccggtgac accgcaacct actactgcgc ccgcattggt 360
cccataaagt acctacggc accttaccga tatttcgact ttggggcca agggacaatg 420
gttactgtct cg 432

<210> 27
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada 969 gH2 (V + constante - hu IgG4P)

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
130 135 140

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210 215 220

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

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

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys
450

<210> 28
<211> 1966
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada 969 gH2 (V + constante - hu IgG4P, exones subrayados)

<400> 28
gaagtgcac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaaac caacccaaac actcactttg 60

acatgtactt ttagtggcct ctcatgact acctatggaa tgggcgtggg atggatcaga 120

cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac 180
 tataaccgt ccctgaaaaa ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg 240
 gtgctgacca tgacaaatat ggatcccgtt gacaccgcaa cctactactg cgccccgatt 300
 ggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg ccaagggaca 360
 atgggtactg tctcgagcgc ttctacaaag ggcccatccg tcttccccct ggcgccctgc 420
 tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggtaagga ctactcccc 480
 gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540
 gctgtctac agtctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtagcgt gccctccagc 600
 agcttgggca cgaagacct aacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg 660
 gacaagagag ttggtgagag gccagcacag ggagggaggg tgtctgctgg aagccaggct 720
 cagccctct gcctggacgc acccggctg tgcagccca gccagggca gcaaggcatg 780
 ccccatctgt ctctcacc ggaggcctt gaccaccca ctcatgcca gggagagggt 840
 ctctggatt ttccaccag gctccgggca gccacaggct ggatgccct acccaggcc 900
 ctgcgcatag aggggcagg gctgcgtca gacctgcaa gagccatag cgaggaggacc 960
 ctgcccctga cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc actccctcag ctcagacacc 1020
 ttctctctc ccagatctga gtaactcca atcttctc tgcagagtcc aaatatggtc 1080
 ccccatgccc accatgcca ggtaagccaa ccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg 1140
 acagggtccc tagagtagcc tgcatccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacgcatcc 1200
 acctcatct ctctcagc acctgagtt ctggggggac catcagtct cctgtcccc 1260
 ccaaaacca aggacactct catgatctc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 1320
 gacgtgagcc aggaagacc cgaggccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg 1380
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1440
 gtcctaccg tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1500
 aaaaaaggcc tccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccac 1560
 ggggtgcgag ggccacatgg acagaggta gctcgccca ccctctgcc tgggagtgc 1620
 cgctgtgcca acctctgtcc ctacaggga gcccagag ccacagggt acaccctgcc 1680
 cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt 1740
 ctccccagc gacatgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa 1800
 gaccagcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttctc ctctacagca ggctaaccgt 1860

ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct 1920

gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg ggtaaa 1966

<210> 29

<211> 472

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

165

170

175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
465 470

<210> 30
<211> 2023
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada 969 gH2 (V + constante - hu IgG4P, exones subrayados) con secuencia de señal subrayada y en cursiva

<400> 30
atggagtggt cctgggtgtt tctgttctc ctgagtgtga ccaccgggg cactccgaa 60

gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa ccaaact cacttgaca 120

tgtactttta gtggcttctc attgactacc tatggaatgg gcgtgggatg gatcagacag 180

ccacctggca aggctctgga atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat 240

aaccgtccc tgaanaaccg gctgaccatt agcaaggata ctctaanaa tcaagtgggtg 300

ctgaccatga caaatatgga tccgttgac accgcaacct actactgcgc ccgcattggt 360

cccataaagt accctacggc acctaccga ttttcgact ttggggcca agggacaatg 420

gttactgtct cgagcgcttc taaaagggc ccatccgtct tcccctggc gccctgctcc 480

aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa 540

ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctcccggt 600

gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660

ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720

aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag 780

ccctcctgcc tggacgcacc ccggctgtgc agccccagcc cagggcagca aggcattgcc 840
catctgtctc ctcaccegga ggcctctgac caccctactc atgcccaggg agagggtctt 900
ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgcccctacc ccaggccctg 960
cgcatacagg ggcagggtgt gcgctcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg 1020
cccctgacct aagccccacc caaaggccaa actctccact ccctcagctc agacaccttc 1080
tctctccca gatctgagta actcccaatc ttctctctgc agagtccaaa tatggtcccc 1140
catgcccacc atgcccaggt aagccaaccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca 1200
gggtgccctag agtagcctgc atccaggga aggccccagc cgggtgctga cgcatccacc 1260
tccatctctt cctcagcacc tgagttctg gggggacat cagtcttct gttccccca 1320
aaaccaagg acactctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 1380
gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 1440
aatgccaaga caaagccgag ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1500
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtga ggtctccaac 1560
aaaggcctcc cgtcctcat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gaccacggg 1620
gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct cggccccacc tctgccctgg gaggaccgc 1680
tgtccaacc tctgtccca cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgcccc 1740
atcccaggag gagatgacca agaaccagg cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 1800
ccccagcgac atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 1860
cacgcctccc gtgtggact ccgacggctc cttctctc tacagcagg taaccgtgga 1920
caagagcagg tggcaggagg ggaatgtct ctcagctcc gtgatgatg aggtctgca 1980
caaccactac acacagaaga gcctctcct gtctctgggt aaa 2023

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marco aceptor VK1 2-1-(1) O12 humano JK4

<400> 31

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 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 32
<211> 321
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marco acceptor VK1 2-1-(1) O12 humano JK4

<400> 32
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctctcac ttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 33
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marco acceptor VH2 3-1 2-70 humano JH3

<400> 33

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Ser

<210> 34
<211> 342
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Marco acceptor VH2 3-1 2-70 humano JH3

<400> 34
caggtcacct tgaaggagtc tggctctgcg ctggtgaaac ccacacagac cctcacactg 60
acctgcacct tctctggggtt ctactcagc actagtggaa tgcgtgtgag ctggatccgt 120
cagccccccag ggaaggccct ggagtggcct gcacgcattg attgggatga tgataaattc 180
tacagcacat ctctgaagac caggctcacc atctcaagg acacctcaa aaaccaggtg 240
gtccttacaa tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300
gcttttgata tctggggcca aggacaatg gtcaccgtct ct 342

<210> 35
<211> 972
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
485 490 495

Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
500 505 510

Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
515 520 525

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
530 535 540

Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
545 550 555 560

Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
565 570 575

Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
580 585 590

Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
595 600 605

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
610 615 620

Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
625 630 635 640

Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
645 650 655

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu

660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
805 810 815

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
820 825 830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
865 870 875 880

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
915 920 925

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

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

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

<210> 36
<211> 277
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos para CSF-1R

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp

100	105	110
Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro		
115	120	125
Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr		
130	135	140
Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala		
145	150	155 160
Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val		
165	170	175
Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu		
180	185	190
Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser		
195	200	205
Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys		
210	215	220
Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys		
225	230	235 240
Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn		
245	250	255
Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met		
260	265	270
Phe Phe Arg Val Val		
275		

<210> 37
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos para CSF-1R

<400> 37

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

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

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

Lys

<210> 38
<211> 493
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos para CSF-1R (SNP V32G, A245S, H247P, V279M,
 posición subrayada)

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val
 290 295 300

Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu
 305 310 315 320

Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr
 325 330 335

Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu
 340 345 350

Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly
355 360 365

Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu
370 375 380

Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys
385 390 395 400

Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser
405 410 415

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

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

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

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

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

<210> 39
<211> 512
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de dominio extracelular CSF-1R humano

<400> 39

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

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
485 490 495

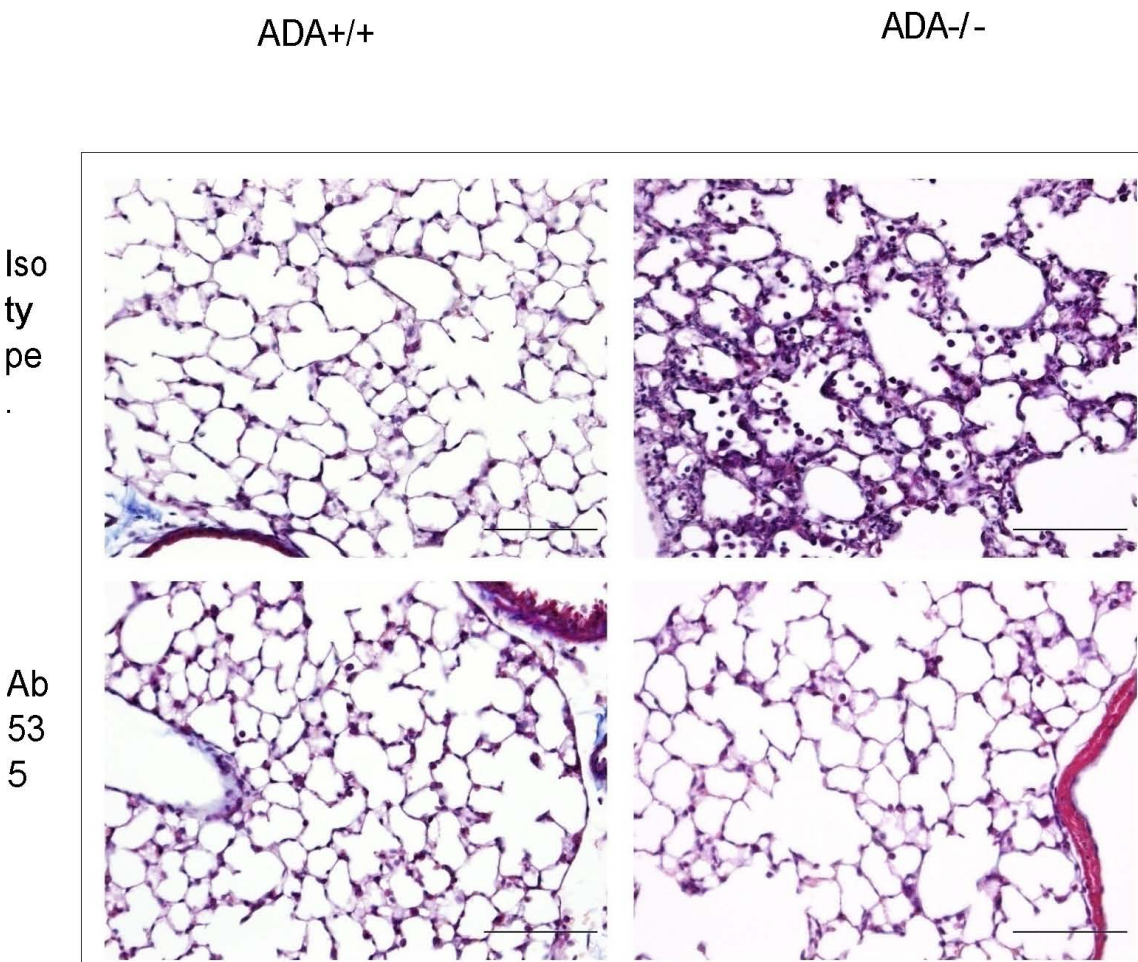
Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	His	Thr	His	Pro	Pro	Asp	Glu
500					505			510							

Resumen

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CSF-1R y fragmentos de unión del mismo, ADN que codifica el mismo, células huésped que comprenden dicho ADN y métodos de expresar el anticuerpo o fragmento de unión en una célula huésped. La presente invención además se extiende a composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo o un fragmento de unión del mismo y el uso del anticuerpo, fragmento de unión y composiciones que comprenden el mismo en tratamiento.

Fig. 4

Figura 21



* Denota una diferencia significativa con respect al ADA⁺ (tipo silvestre); # denota una diferencia significativa con respecto a ratones ADA⁻ tratados con anticuerpo de control de isotopo ($p \leq 0,05$).

Figura 20c

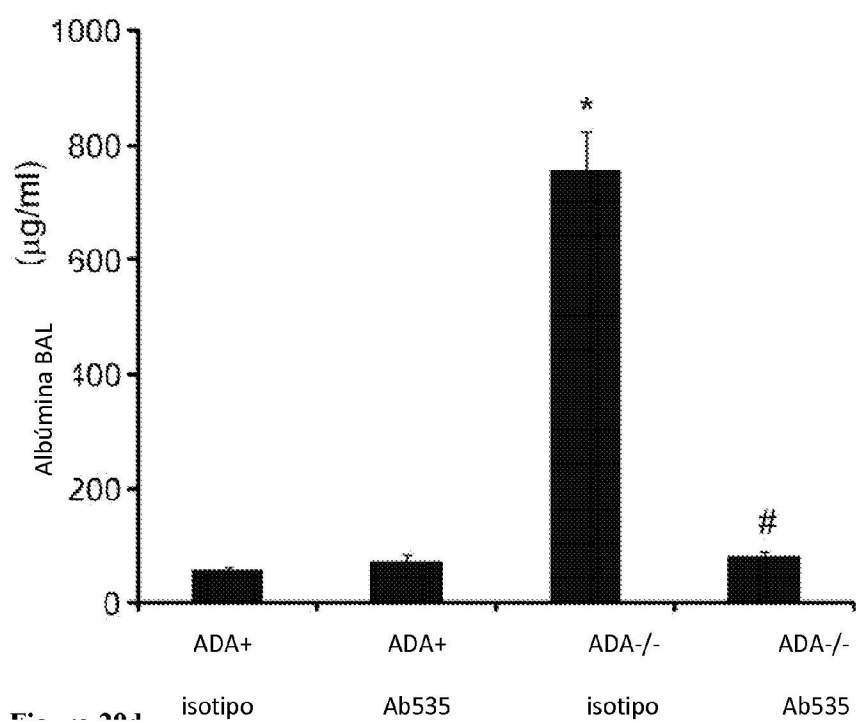


Figura 20d

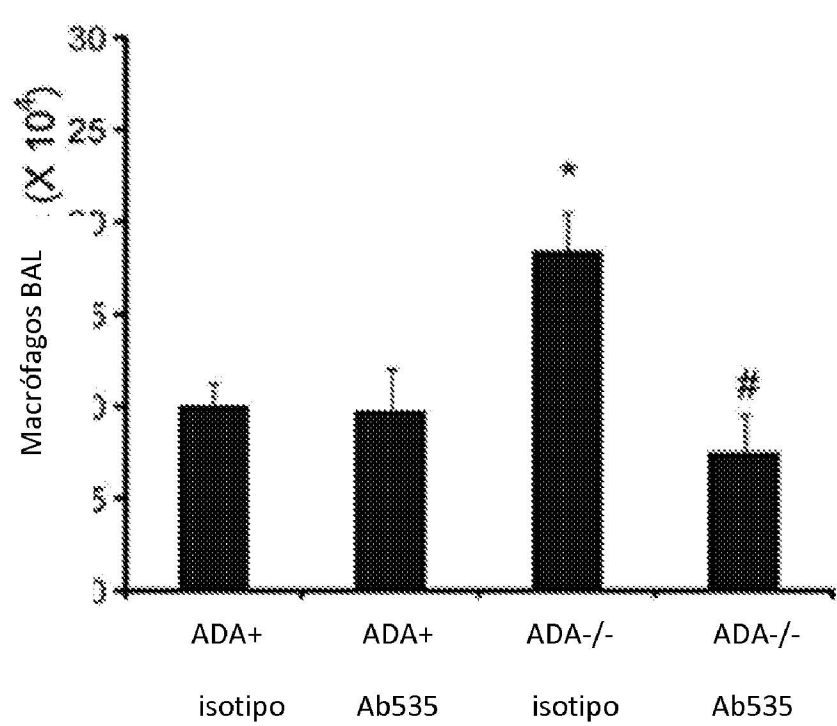


Figura 20b

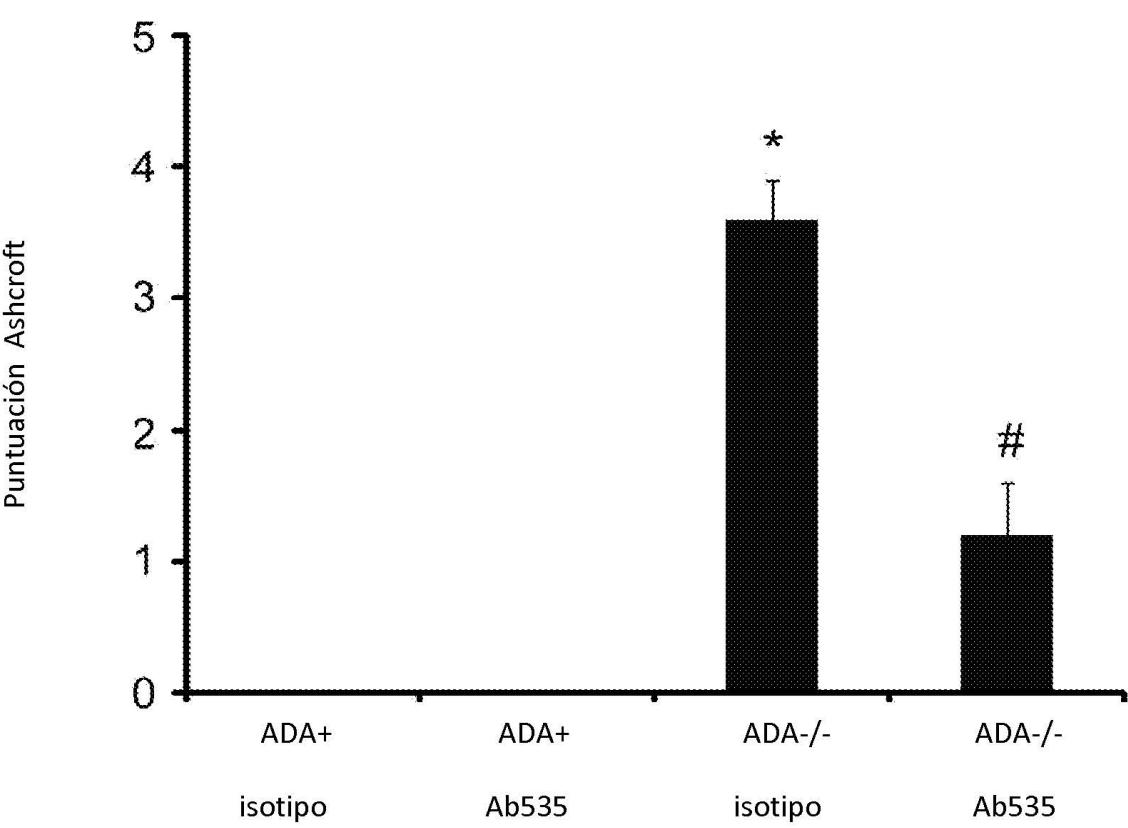


Figura 20a

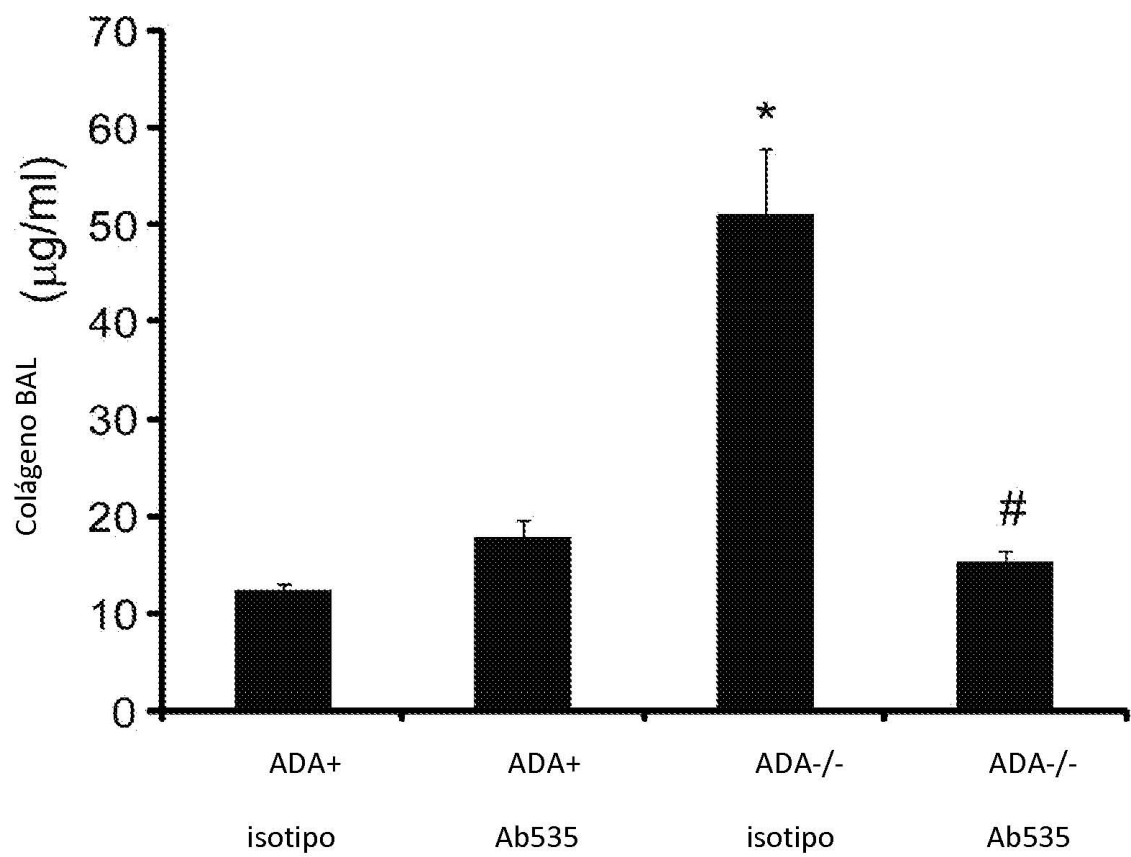


Figura 19

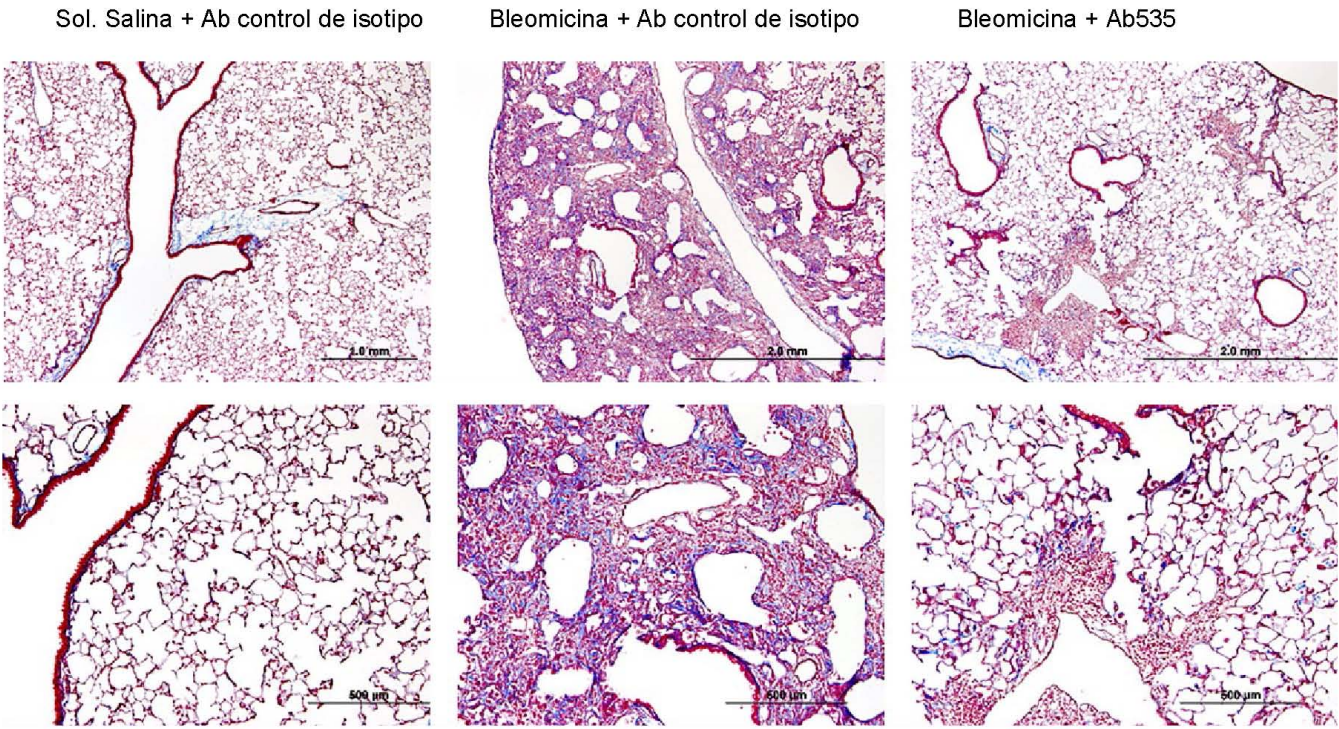


Fig 18d:

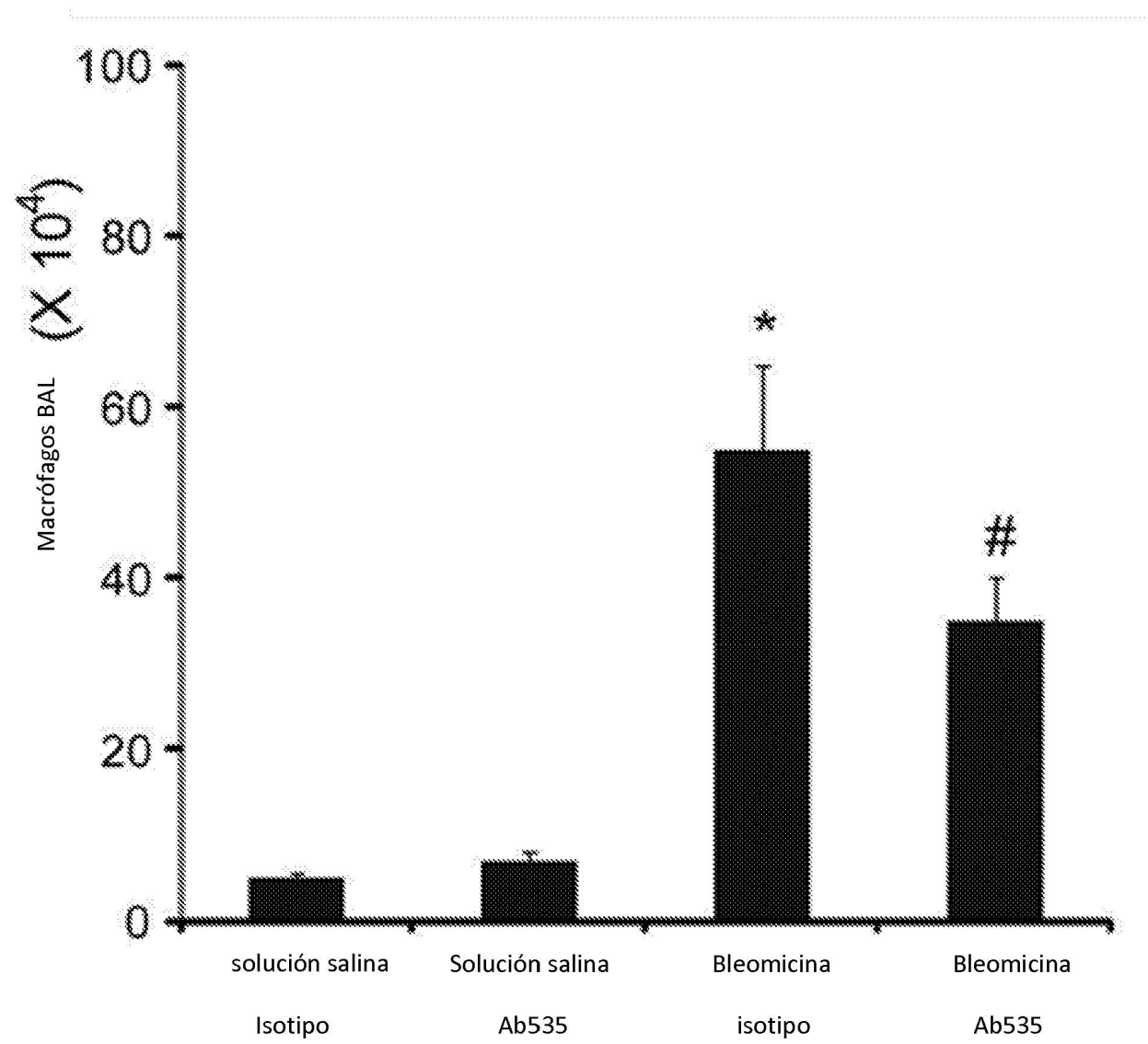


Figura 18c

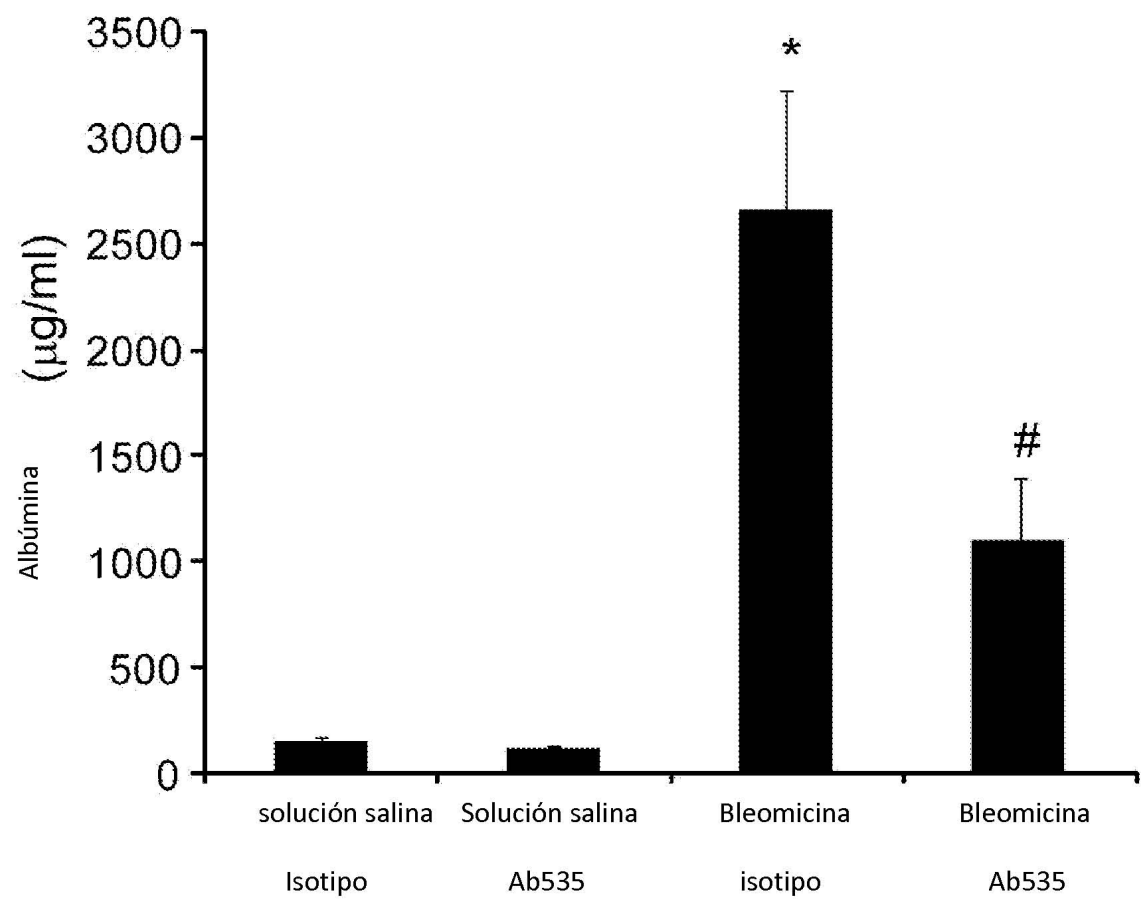


Figura 18b

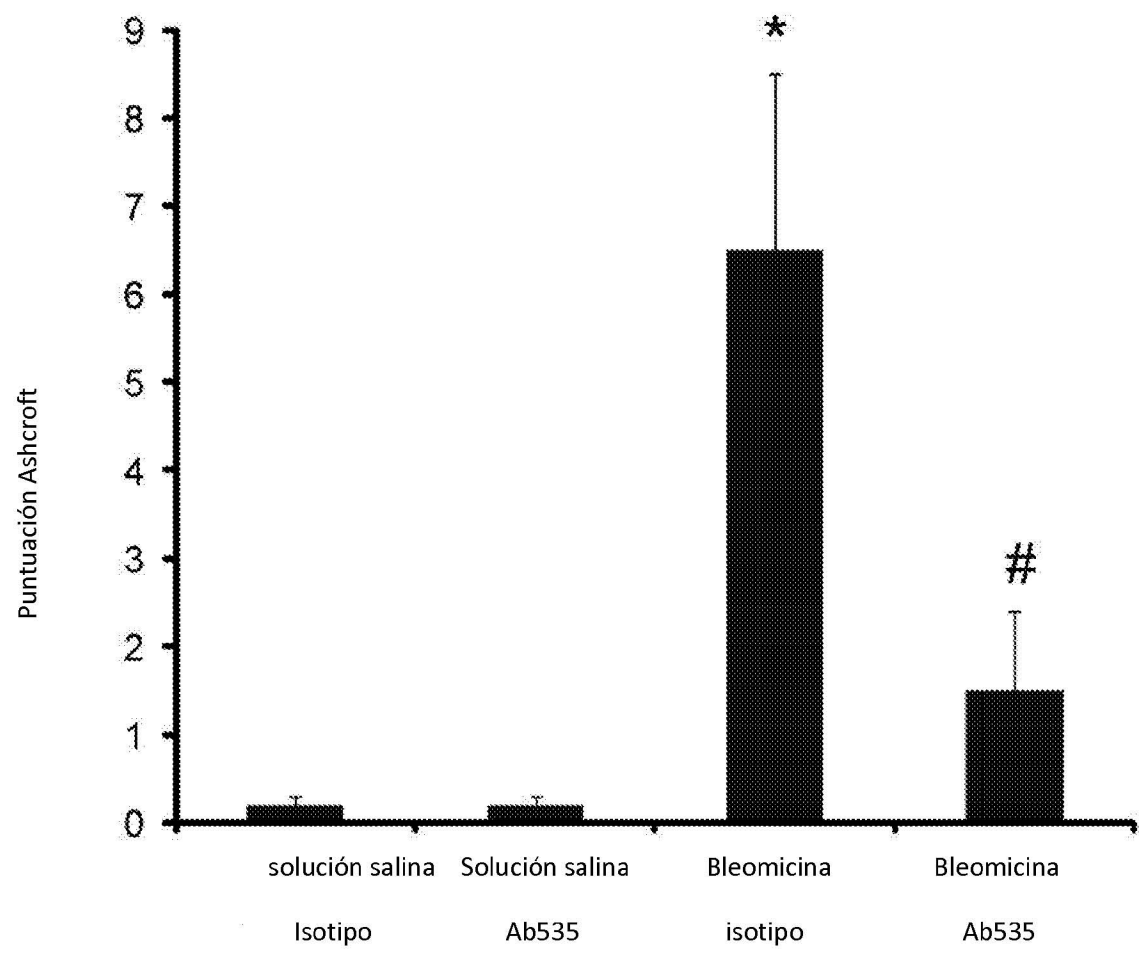


Figura 18a

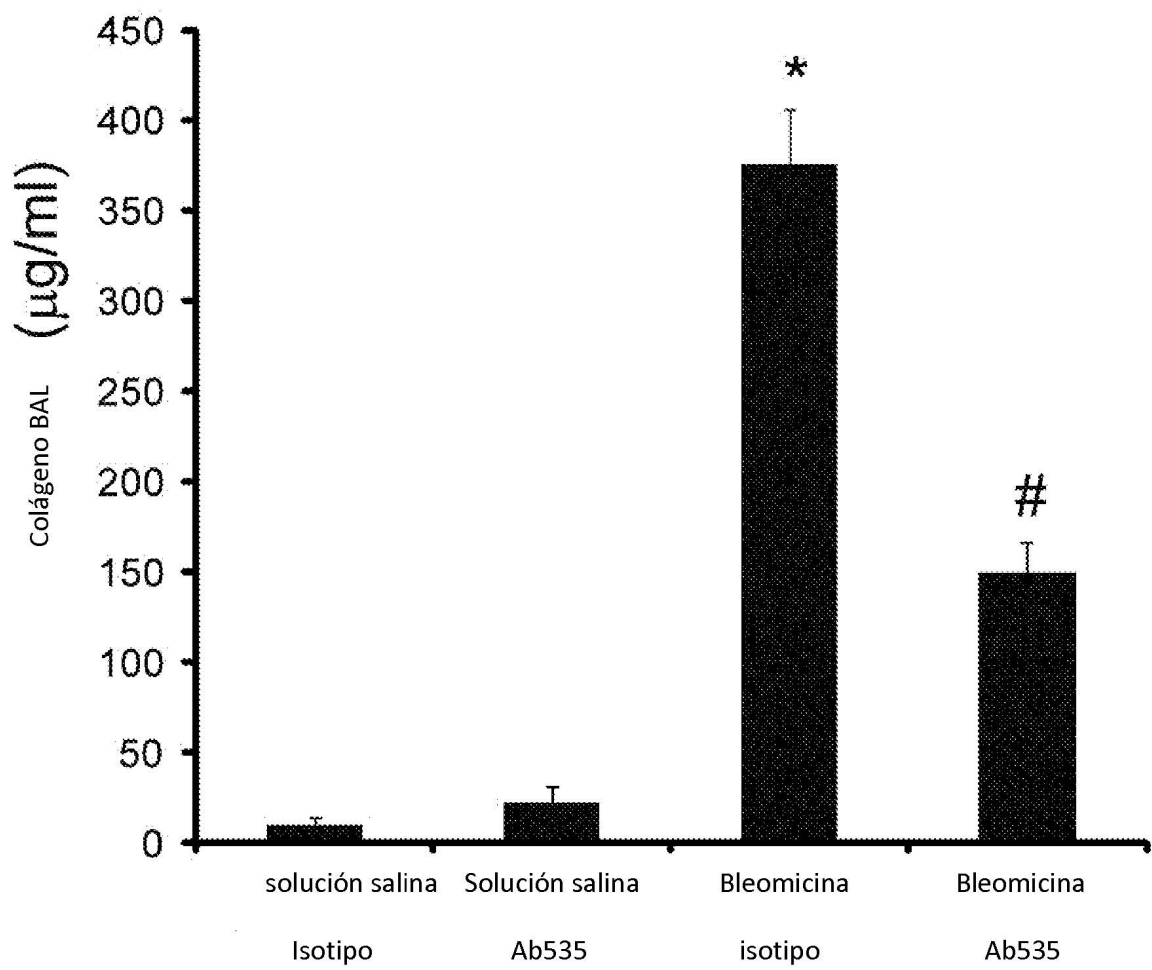


FIGURA 17

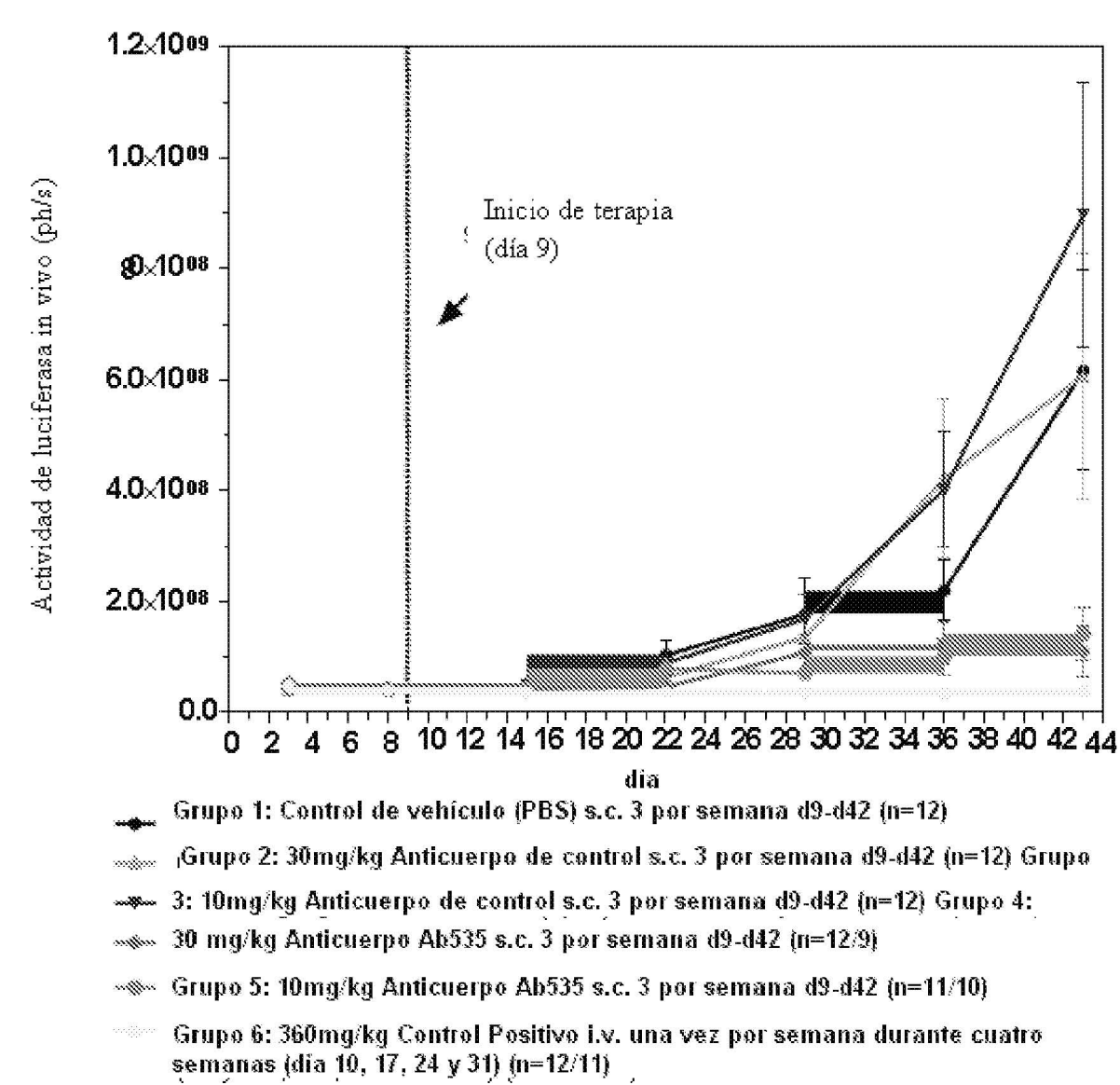


FIGURE 16

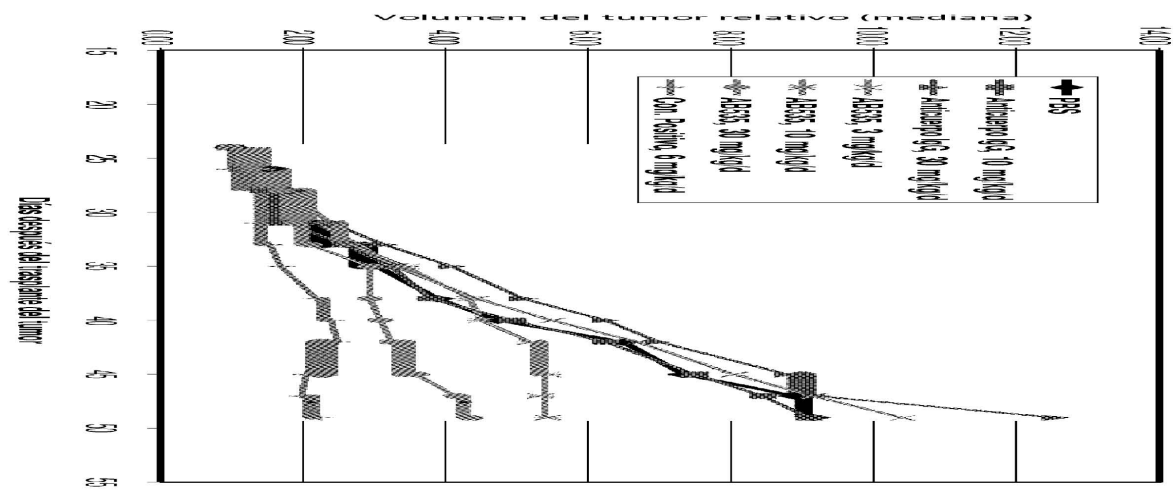


Figura 15c

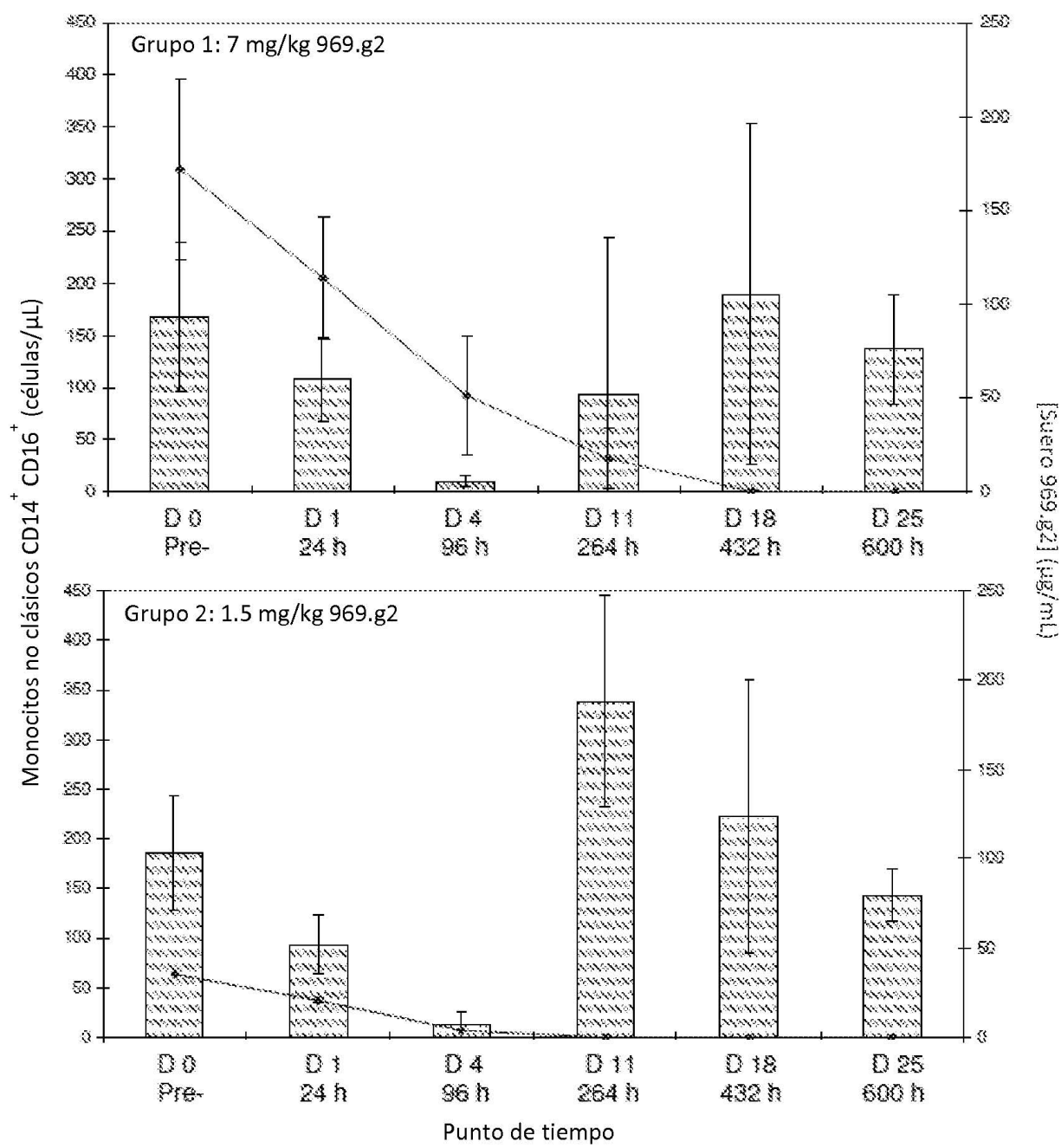


FIGURE 15a

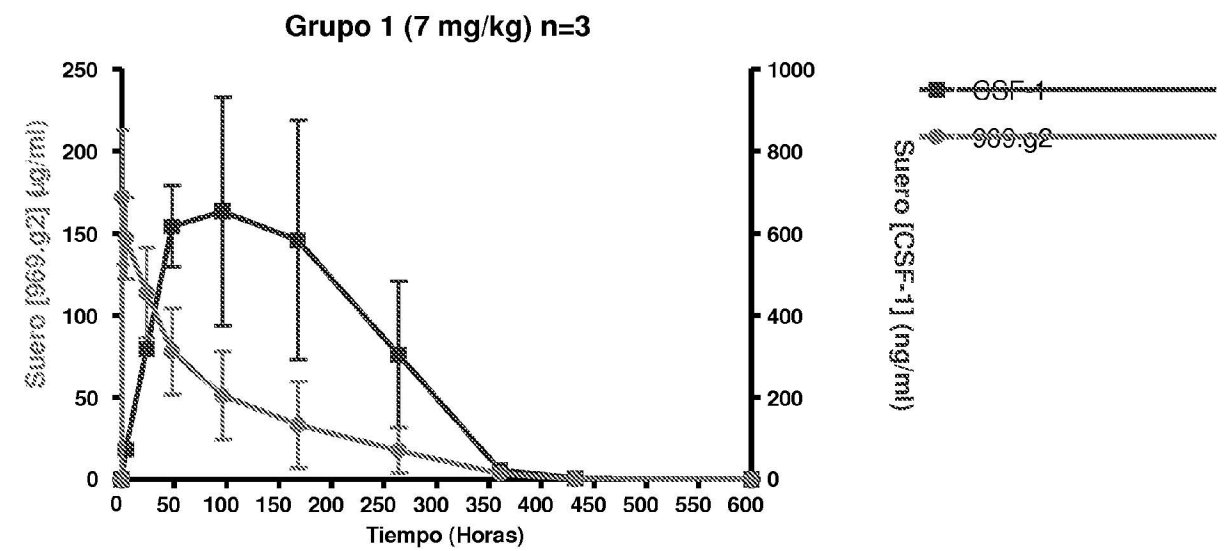


FIGURE 15b

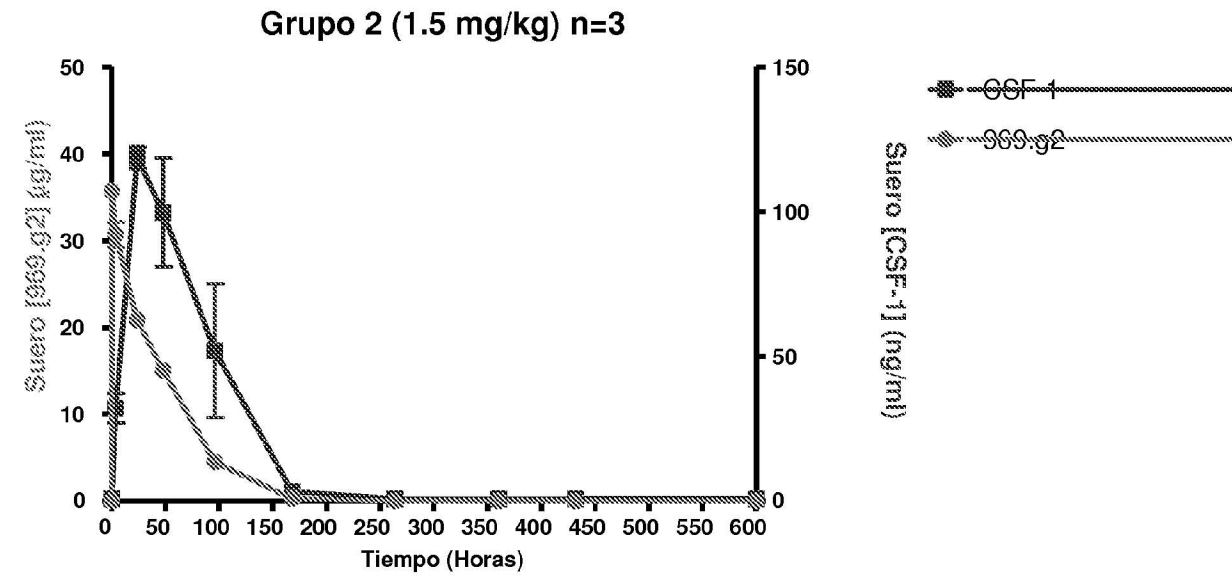


FIGURE 14

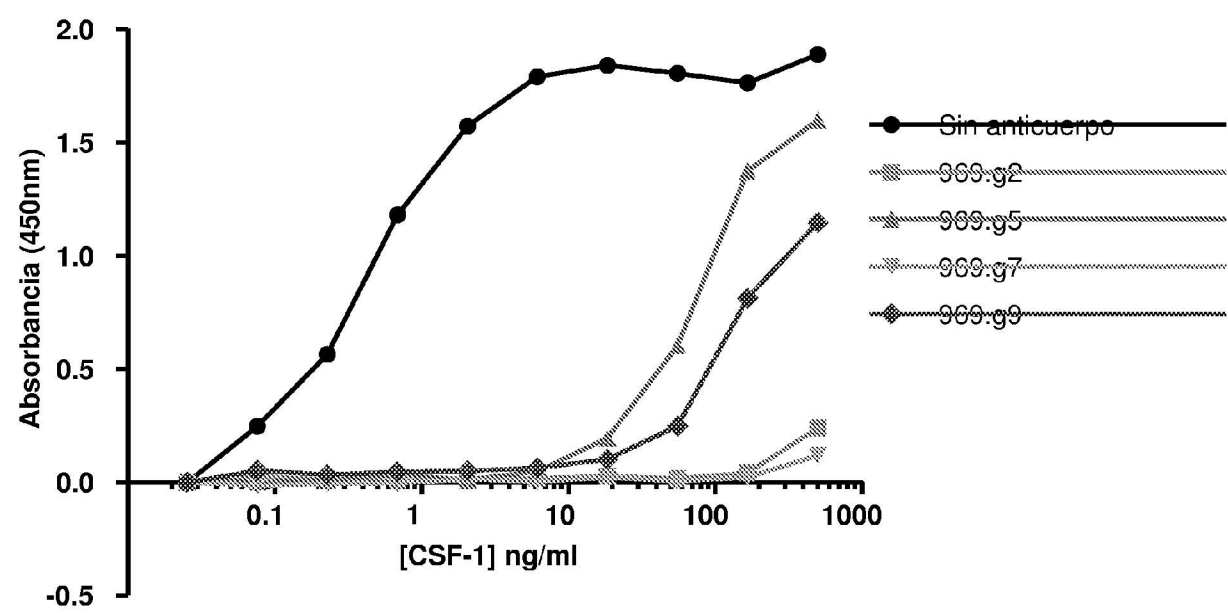


FIGURA 13

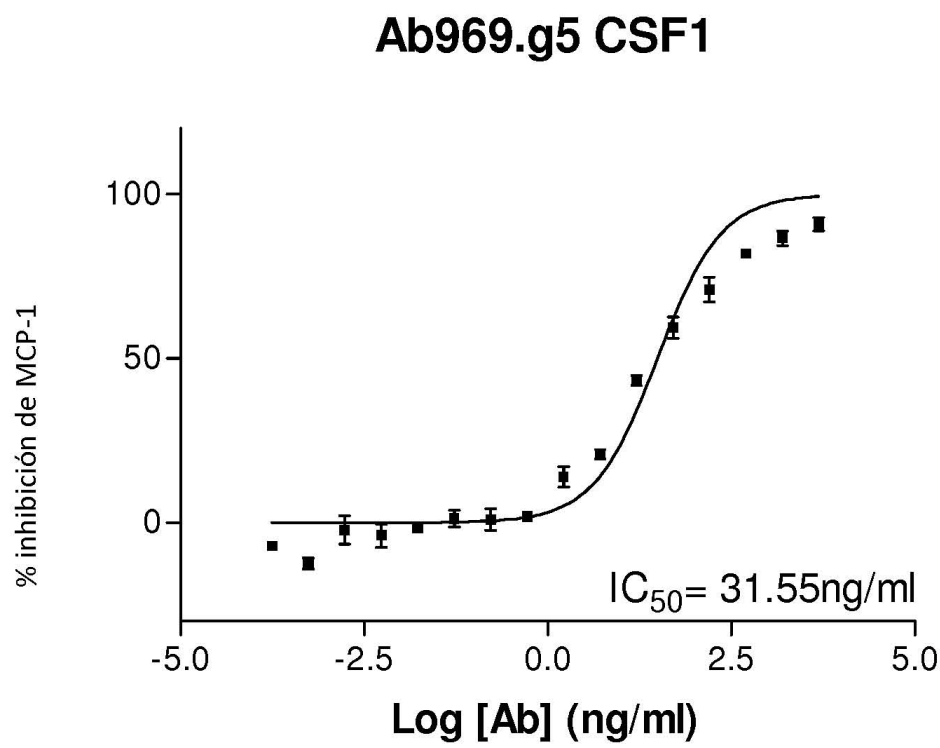
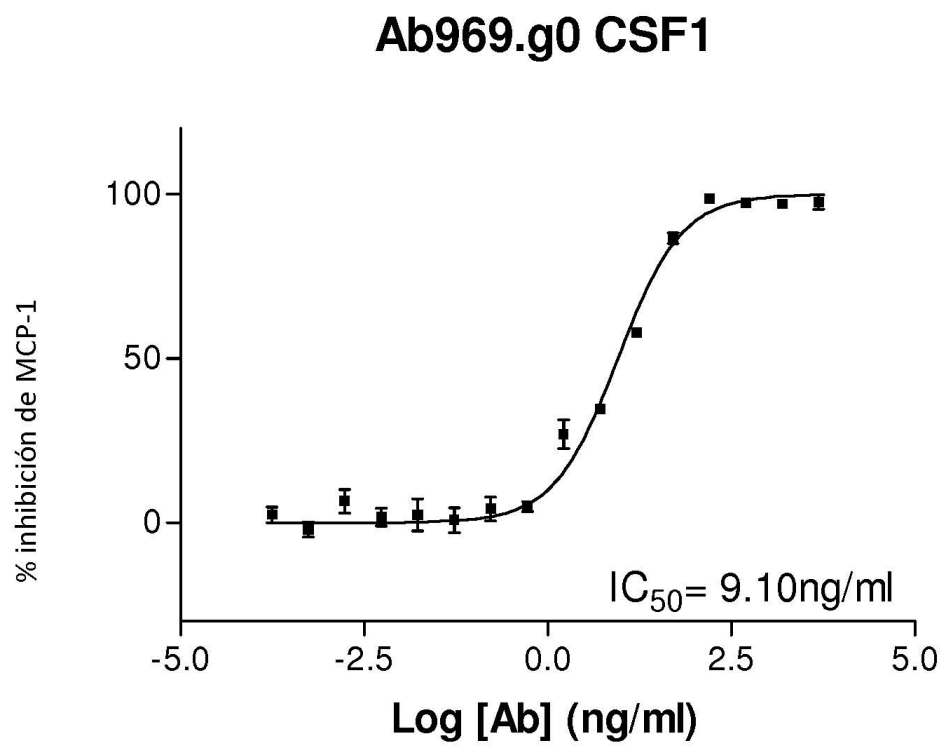


FIGURE 12

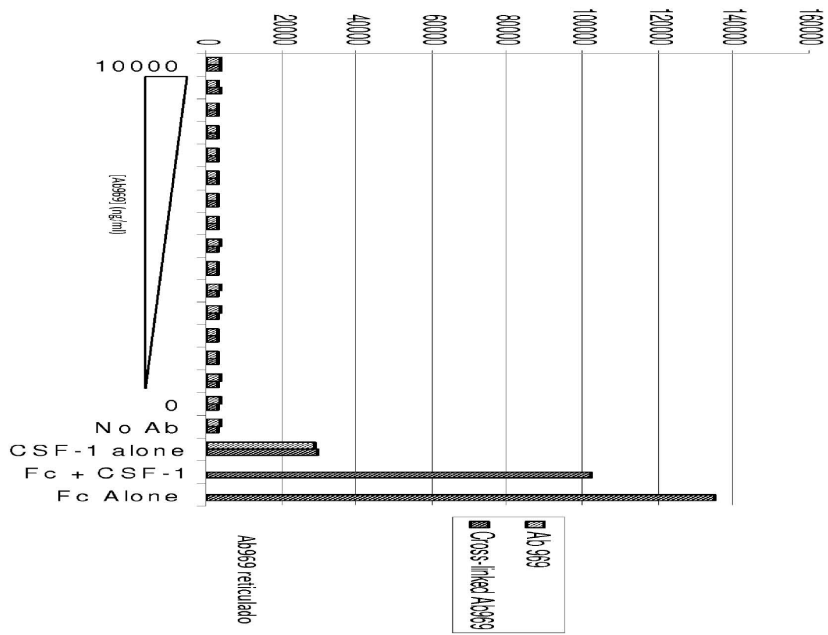


FIGURE 10

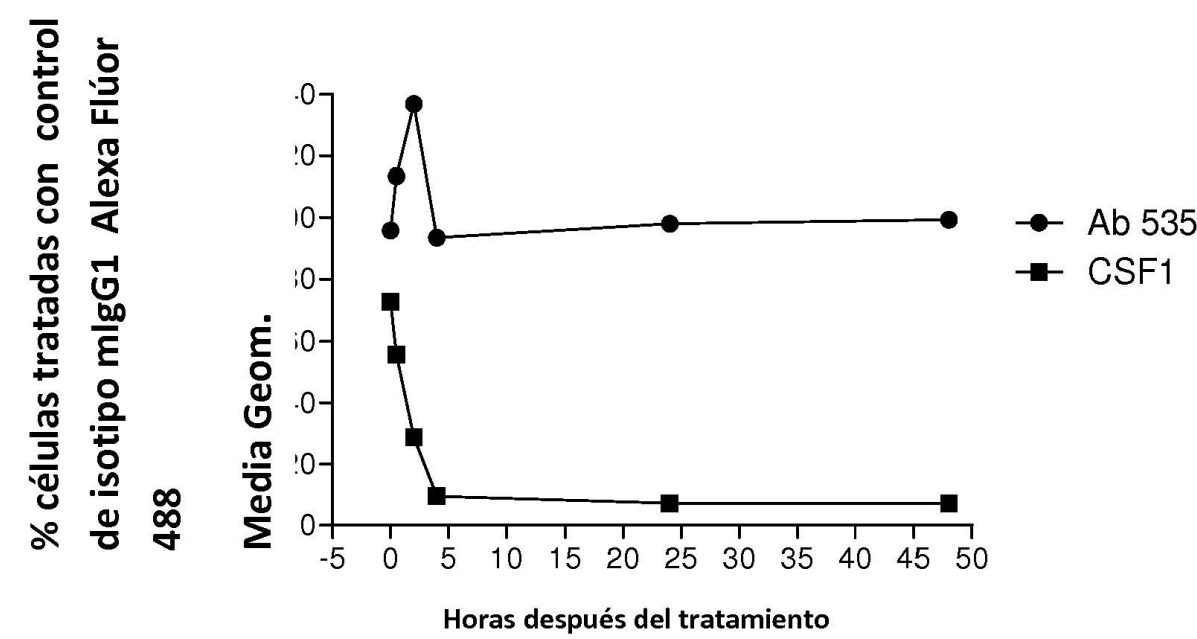


FIGURE 11

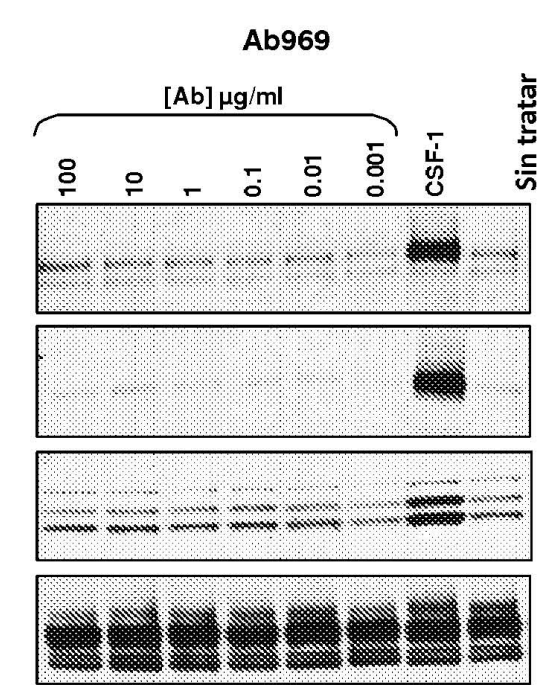


FIGURE 8

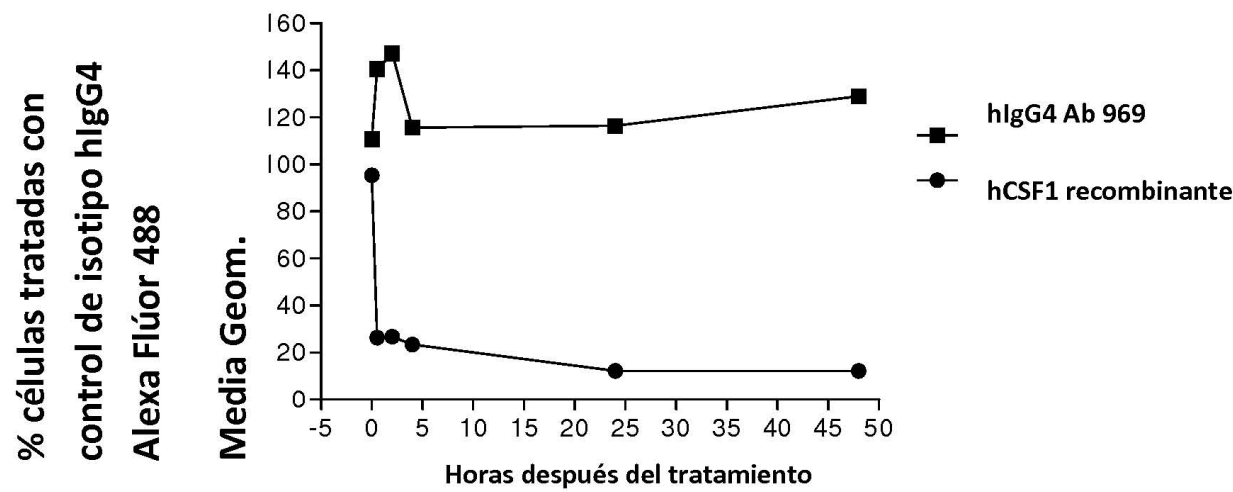


FIGURE 9

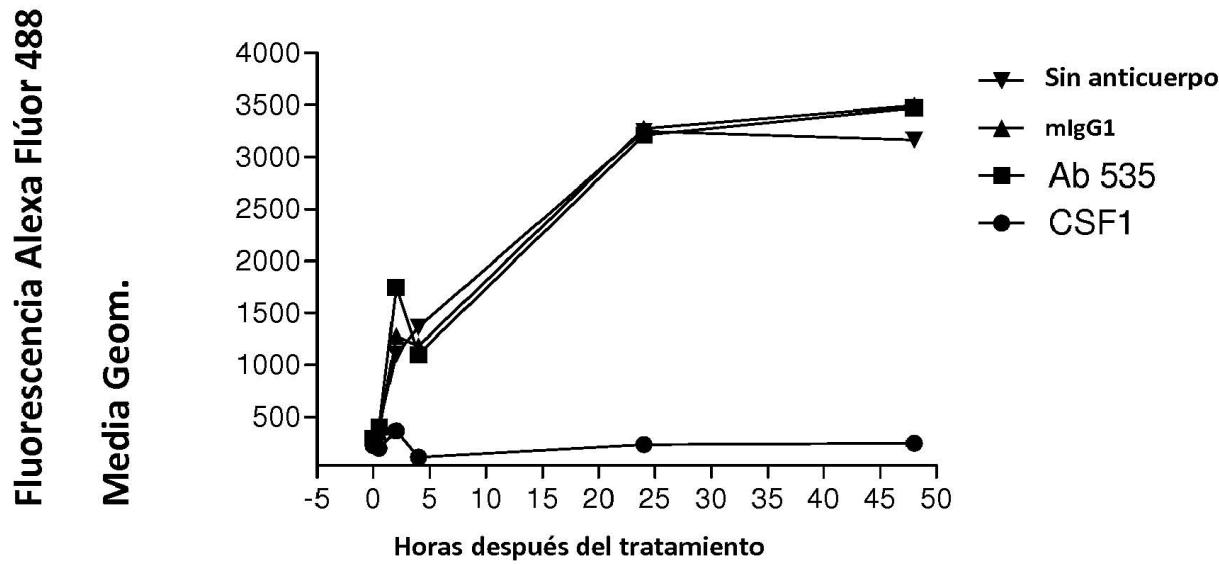


FIGURE 7

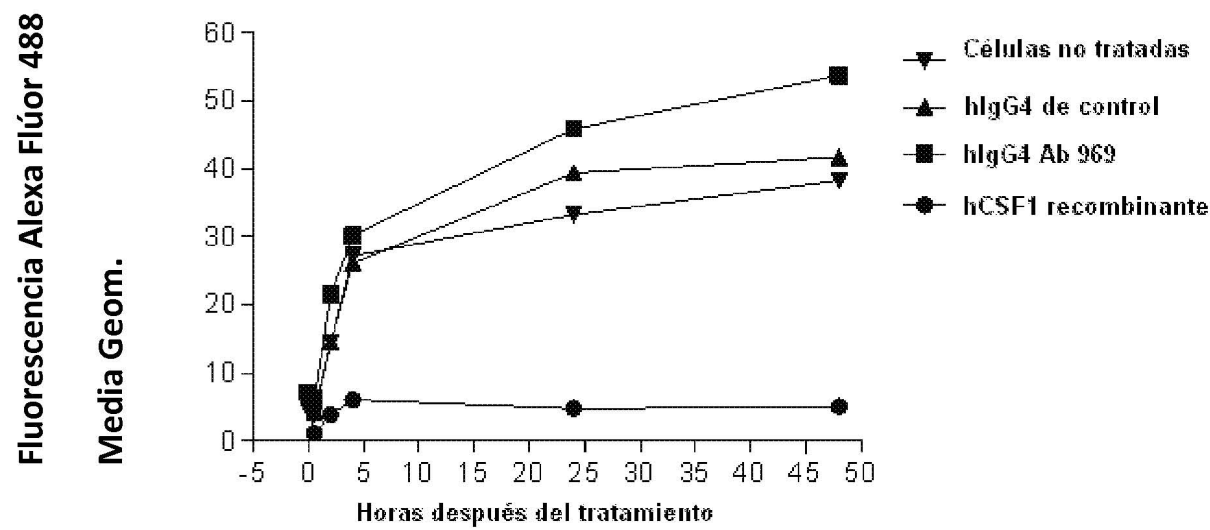


FIGURA 6

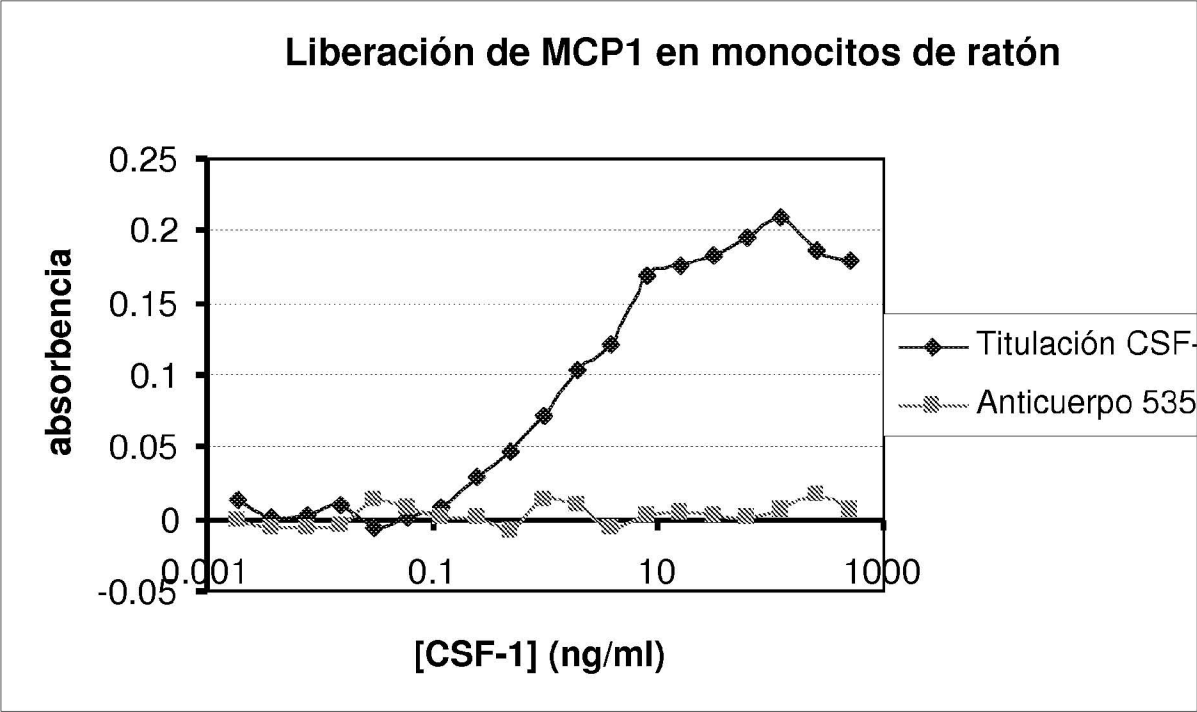


FIGURA 5b

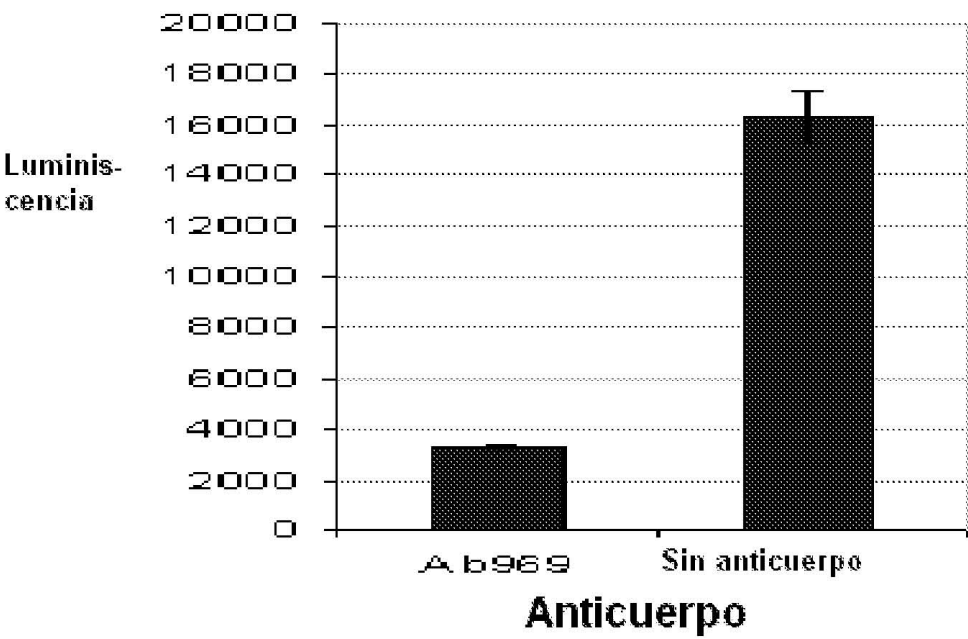


FIGURA 5a

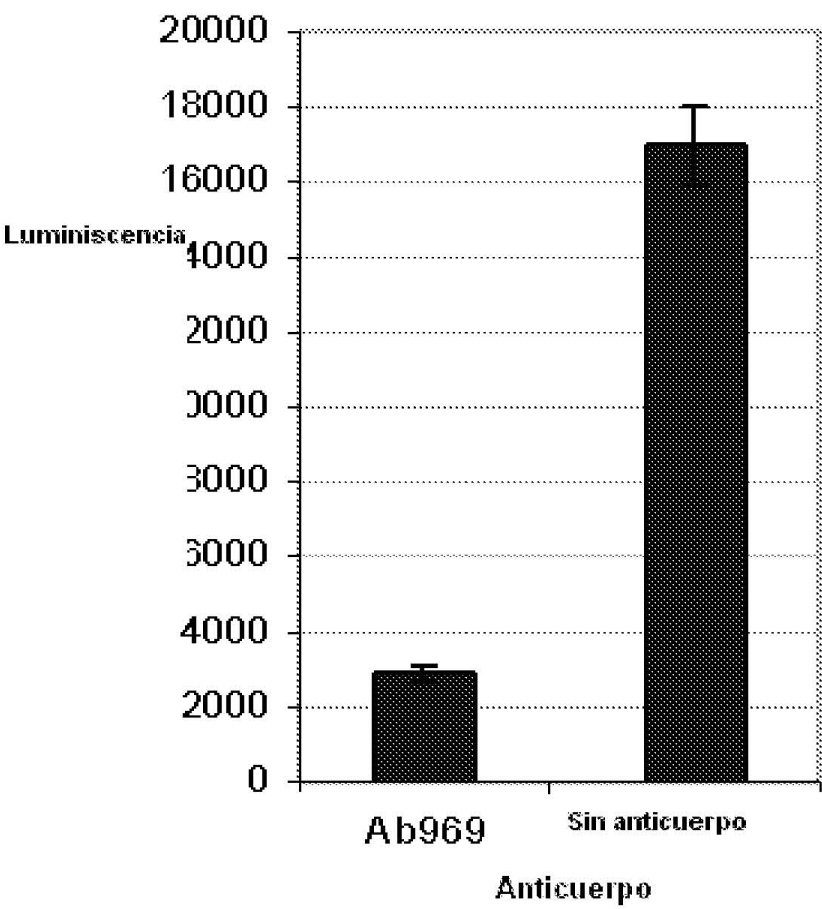


FIGURA 4

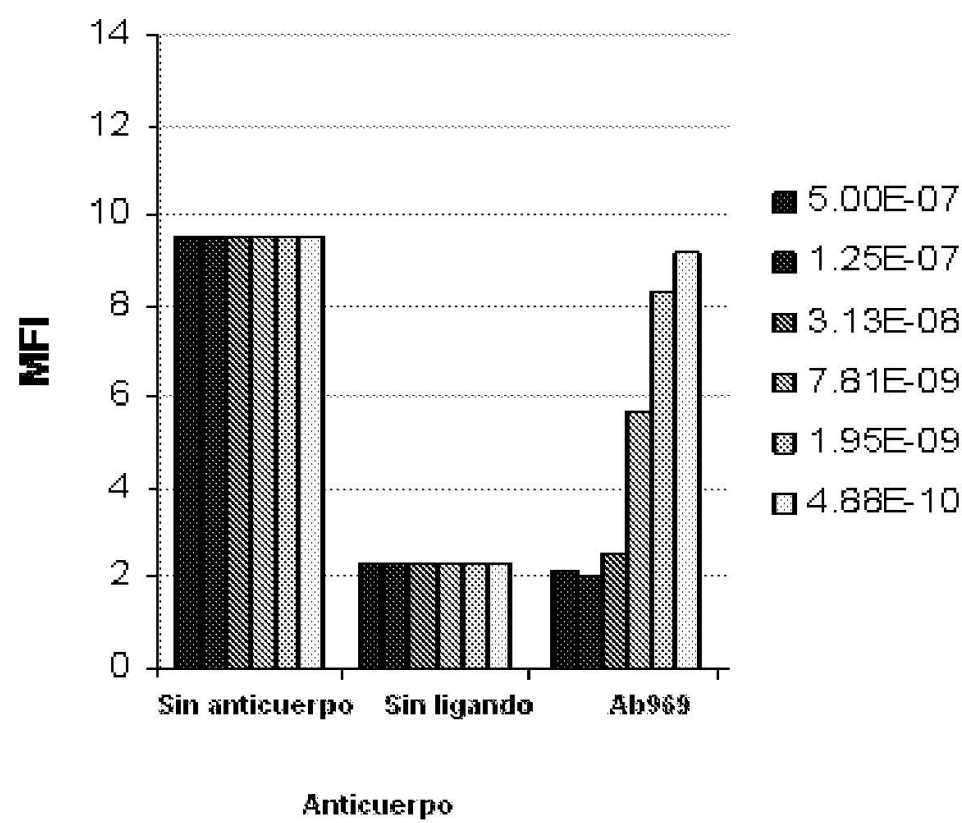


FIGURA 3

SEQ ID NO: 39

MGPGLLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW DGPPSPHWTLL YSDGSSSILS
TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPAHPWNV LAQEVVVVFED QDALLPCLLT DPVLEAGVSL
VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA
ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDVFLQHN NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA
SNVQGKHSTS MFFRVVESAY LNLSSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK
LANATTKDTY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWTf INSGTLLCA
ASGYPPQPNVT WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS
VSGSGWAFIP ISAGATHPP DE

FIGURA 2A

Injerto de CADENA LIGERA 969

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105
Ligera 969	DIQMTQSPASLSASLGETVSI	ECL	<u>LASEDIYDNLA</u>	WYQKKPGKSPHLLIY	<u>YASSLQD</u>	GVPSRFGSGSGTQYSLKINSLESEDAATYFC	<u>LQDSEYPWT</u>	FGGGTKLELK														
VK1 2-1-(1) 012	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTTC	<u>RASQS</u>	<u>ISSYLN</u>	WYQQKPGKAPKLLIY	<u>AASSLQ</u>	SGVPSRFGSGSGTDF	TLTISSSLQPEDFATYYC	<u>QQSVSTPLT</u>	FGGGTKVEIK												
969 gL7	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTTC	<u>LASEDIYDNLA</u>	WYQQKPGKAPKLLIY	<u>YASSLQD</u>	GVPSRFGSGSGTDY	TLTISSSLQPEDFATYYC	<u>LQDSEYPWT</u>	FGGGTKVEIK													

Leyenda

- 969 = secuencia de cadena ligera variable de rata
- 969 gL7 = injerto humanizado de cadena ligera variable de 969 que usa VK1 2-1-(1) 012 más línea germinal humana JK4 como marco aceptor.

Las CDR se muestran en negrilla/subrayadas
El residuo de donante se muestra en negrilla/cursiva y se resalta: Y71

VSVIWTFFINGSGTLLCAASGYPPQPNVTWLQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYPEVLSQEPFHKVT
VQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAHTHPPDE

FIGURA 1F

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

MGPGVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNGSVEW
DGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDP LGGSAAIHLY
VKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRP
LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVI
PGPPALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIPQQS
DFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSVCVASNVQKGHSTSMFFRVV
YSCV
ASN
VQ
KG
HS
TS
M
FF
RV
V

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

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRP
LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVI
PGPPALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIPQQS
DFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSVCVASNVQKGHSTSMFFRVV

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

MRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQK

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

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYR
CTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRP
LMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVI
PGPPALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIHQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGN
YSCV
ASN
VQ
KG
HS
TS
M
FF
RV
V
ES
AY
LN
LS
SE
QN
LI
QE
VT
VG
EGL
NL
KV
MVE
AY
PG
LQ
GF
NW
TY
L
G
PF
SD
H
Q
PE
PK
LA
NA
TT
K
D
TY
R
HT
FT
LS
LP
RL
KP
SE
AG
RY
S
FL
AR
NP
GG
WR
AL
TF
EL
TL
RY
PP
E

FIGURA 1E

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQSSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA
ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVEIK

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

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

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

QVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TSGMRVSWIR QPPGKALEWL
ARIDWDDDKF YSTSLKTRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
AFDIWGQGTM VTVS

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

caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgcg ctggtgaaac ccacacagac
cctcacactg acctgcacct tctctggggt ctcactcagc actagtggaa
tgcgtgtgag ctggatccgt cagccccag ggaaggccct ggagtggctt
gcacgcattg attgggatga tgataaattc tacagcacat ctctgaagac
caggctcacc atctccaagg acacctccaa aaaccagggtg gtccttacia
tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata
gcttttgata tctggggcca aggacaaatg gtcaccgtct ct

cagtcttcct gttccccca aaaccaagg acacttcat gatctcccg
acccctgagg tcacgtgct ggtggtggac gtgagccagg aagacccga
ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga
caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa
ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag
ccaaaggtgg gacccacggg gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct
cgccccacc tctgccctgg gagtgaccgc tgtgccaacc tctgtcccta
cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca cctgcccc atcccaggag
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctggtca aaggcttcta
cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca
actacaagac cagcctccc gtgetggact ccgacggctc cttcttctc
tacagcaggc taaccgtgga caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt
ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga
gcctctccct gtctctgggt aaa

Cadena pesada 969 gH2 (V + constante – hu IgG4P) con secuencia de señal subrayada y en cursiva

SEQ ID NO:29

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

Cadena pesada 969 gH2 (V + constante – hu IgG4P, exones subrayados) con secuencia de señal subrayada y en cursiva

SEQ ID NO:30

atggagtggt cctgggtggt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggt
ccactccgaa *gtgacactca* *aggagtctgg* *acccgctctg* *gtgaaaccaa*
cccaaact *cactttgaca* *tgtactttta* *gtggcttctc* *attgactacc*
tatggaatgg *gcgtgggatg* *gatcagacag* *ccacctggca* *aggctctgga*
atggctggcc *aacatctggt* *gggatgacga* *caagtactat* *aaccggtccc*
tgaaaaaccg *gctgaccatt* *agcaaggata* *cttctaaaaa* *tcaagtgggtg*
ctgaccatga *caaatatgga* *tcccgttgac* *accgcaacct* *actactgcgc*
ccgcattggt *cccataaagt* *accctacggc* *accttaccga* *tatttcgact*
tttggggcca *agggacaatg* *gttactgtct* *cgagcgcttc* *tacaaagggc*
ccatccgtct *tccccctggc* *gcctgctcc* *aggagcacct* *ccgagagcac*
agccgccctg *ggctgcctgg* *tcaaggacta* *cttccccgaa* *ccggtgacgg*
tgctgtggaa *ctcaggcgcc* *ctgaccagcg* *gcgtgcacac* *cttcccggct*
gtcctacagt *cctcaggact* *ctactcctc* *agcagcgtgg* *tgaccgtgcc*
ctccagcagc *ttgggcacga* *agacctacac* *ctgcaacgta* *gatcacaagc*
ccagcaacac *caaggtggac* *aagagagttg* *gtgagaggcc* *agcacaggga*
gggaggggtg *ctgctggaag* *ccaggctcag* *ccctcctgcc* *tggacgcacc*
ccggctgtgc *agccccagcc* *cagggcagca* *aggcatgccc* *catctgtctc*
ctcacccgga *ggcctctgac* *caccacctc* *atgccaggg* *agagggtctt*
ctggattttt *ccaccaggct* *ccgggcagcc* *acaggctgga* *tgcccctacc*
ccaggccctg *cgcatacagg* *ggcagggtgt* *gcgtcagac* *ctgccaagag*
ccatatccgg *gaggacctg* *cccctgacct* *aagcccaccc* *caaaggccaa*
actctccact *ccctcagctc* *agacaccttc* *tctcctccca* *gatctgagta*
actcccaatc *ttctctctgc* *agagtccaaa* *tatgggtccc* *catgcccacc*
atgcccaggt *aagccaaccc* *aggcctcgcc* *ctccagctca* *aggcgggaca*
ggtgccctag *agtagcctgc* *atccaggggac* *aggccccagc* *cgggtgctga*
cgcattccacc *tccatctctt* *cctcagcacc* *tgagttcctg* *gggggaccat*

QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSGDSF FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
 LGK

Cadena pesada 969 gH2 (V + constante – hu IgG4P, exones subrayados) SEQ ID NO:28

gaagtgacac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaaac caacccaaac
actcactttg acatgtactt ttagtggtt ctcattgact acctatggaa
tgggcgtggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccctg cctgaaaaa
ccggtgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg gtgctgacca
tgacaaatat ggatcccggtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcat
ggccccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg
ccaagggaca atgggttactg tctcgagcgc ttctacaaag ggcccatccg
tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg
gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac
agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc
agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa
caccaagggtg gacaagagag ttggtgagag gccagcacag ggagggaggg
tgtctgctgg aagccaggct cagccctcct gcctggaagc accccggctg
tgcagcccca gccagggca gcaaggcatg ccccatctgt ctctcaccc
ggaggcctct gaccacccca ctcatgcca gggagaggggt cttctggatt
tttccaccag gctccgggca gccacaggct ggatgcccct accccaggcc
ctgcgcatac aggggcagggt gctgcgctca gacctgcaa gagccatata
cgggaggacc ctgcccctga cctaagccca ccccaaaggc caaactctcc
actccctcag ctgagacacc ttctctcttc ccagatctga gtaactccca
atcttctctc tgcagagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc
ggtaagccaa cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg acagggtgcc
tagagtagec tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacgcattc
acctccatct ctctctcagc acctgagttc ctgggggggac catcagttct
cctgttcccc ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggacccttg
aggtcacgtg cgtgggtggtg gacgtgagcc aggaagaccc cgagggtccag
ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc
gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg
tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caagggtctcc
aacaaaggcc tcccgtcttc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg
tgggacccac ggggtgagag ggccacatgg acagaggtca gctcggccca
ccctctgccc tgggagtgac cgctgtgcca acctctgtcc ctacagggca
gccccgagag ccacagggtg acaccctgcc cccatcccag gaggagatga
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa
gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca
ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc
cctgtctctg ggtaaa

FIGURA 1D

Región V de 969 gH2 SEQ ID NO:23

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
ANIWWDKKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
GPIKYPTAPY RYFDFWGQGT MVTVS

Región V de 969 gH2 SEQ ID NO:24

gaagtgacac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaaac caacccaaac
actcactttg acatgtactt ttagtggtt ctcattgact acctatggaa
tgggcgtggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccctg ccctgaaaaa
ccggtgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtgt gtgctgacca
tgacaaatat ggatcccggtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcat
ggteccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg
ccaagggaca atgggttactg tctcg

Región V de 969 gH2 con secuencia de señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO:25

MEWSWVFLFF *LSVTTGVHSE* VTLKESGPAL VKPTQTLTLT CTFSGFSLTT
YGMGVGWIRQ PPGKALEWLA NIWWDKKYY NPSLKNRLTI SKDTSKNQVV
LTMTNMDPVD TATYYCARIG PIKYPTAPYR YFDFWGQGTMT VTVS

Región V de 969 gH2 con secuencia de señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO:26

atggagtggt cctgggtggt tctgttcttc ctgagtgtga ccaccggggt
ccactccgaa gtgacactca aggagtctgg acccgctctg gtgaaaccaa
cccaaact cactttgaca tgtactttta gtggcttctc attgactacc
tatggaatgg gcggtgggatg gatcagacag ccacctggca aggctctgga
atggctggcc aacatctggt gggatgacga caagtactat aaccggtccc
tgaaaaaccg gctgaccatt agcaaggata cttctaaaaa tcaagtgggtg
ctgaccatga caaatatgga tcccggtgac accgcaacct actactgcgc
ccgcatgtgt cccataaagt accctacggc accttaccga tatttcgact
tttggggcca agggacaatg gttactgtct cg

Cadena pesada 969 gH2 (V + constante – hu IgG4P) SEQ ID NO:27

EVTLKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
ANIWWDKKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
GPIKYPTAPY RYFDFWGQGT MVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA
LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVTVPS
SLGTKTYTCN VDHKPSNTKV DKRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcc a gtgtgggaga
cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg
catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt
ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat ctgtcttcat
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

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

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY
DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP
EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA
SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

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

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
cgcaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgcc a
gtgtgggaga cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac
gataacctgg catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct
gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
cttcggtggt ggcaccaaag tggaaatcaa gcgtacggta gcggcccat
ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc
tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca
gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca
cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac
ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt
gt

FIGURA 1C

Región V de 969 gL7 SEQ ID NO:15

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
GTKVEIK

Región V de 969 gL7 SEQ ID NO:16

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccca gtgtggggaga
caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg
catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtggt
ggcaccaaag tggaaatcaa g

Región V de 969 gL7 con secuencia de señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO:17

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

Región V de 969 gL7 con secuencia de señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO:18

atgagcgtgc ctactcaagt cttggggctg ctcttgcttt ggcttaccga
cgcaagatgc gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccca
gtgtggggaga caggggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac
gataacctgg catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct
gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg
gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg
gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac
cttcgggtggt ggcaccaaag tggaaatcaa g

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

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

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

gcaaacattt ggtgggatga tgataagtat tacaatccat ctctgaaaaa
 ccggctcaca atctccaagg acacctccaa caaccaagca ttcctcaagc
 tcaccaatgt acacacttca gattctgcca catactactg tgctcggata
 gggccgatta aatacccgac ggccccctac cggctactttg acttctgggg
 cccaggaacc atggtcaccg tctcg

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

MDRLTSSFL*L* LIVPAYVLS*Q* VTLKESGPGI LQPSQTL~~SLT~~ CTFSGFSL~~TT~~
 YGMGVGWIRQ PSGKGLEWLA NIWDDDKYY NPSLKNRLTI SKDTSNNQAF
 LKLTNVHTSD SATYYCARIG PIKYPTAPYR YDFWGP~~GT~~M VTVS

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

atggacaggc ttacttcctc attcctactg ctgattgtcc ctgcatatgt
cctgtctcag gttactctga aagagtctgg cctgaggata ttgcagccct
 ccagaccct cagtctgact tgcactttct ctgggttttc actgaccact
 tatggtatgg gtgtgggctg gattcgtcag ctttcaggga agggctctgga
 gtggctggca aacatttggg gggatgatga taagtattac aatccatctc
 tgaaaaaccg gctcacaatc tccaaggaca cctccaacaa ccaagcattc
 ctcaagctca ccaatgtaca cacttcagat tctgccacat actactgtgc
 tcggataggg ccgattaaat acccgacggc cccctaccgg tactttgact
 tctggggccc aggaaccatg gtcaccgtct cg

FIGURA 1B

Región VL de Ab 969 de rata SEQ ID NO:7

DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY DNLAWEYQKKP GKSPHLLIYY
ASSLQDGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLES EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG
GTKLELK

Región VL de Ab 969 de rata SEQ ID NO:8

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

Región VL de Ab 969 de rata con secuencia de señal subrayada y en cursiva SEQ ID NO:9

MGVPTQLLV LLLWITDAIC DIQMTQSPAS LSASLGETVS IECLASEDIY
DNLAWEYQKKP GKSPHLLIYY ASSLQDGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLES
EDAATYFCLQ DSEYPWTFGG GTKLELK

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

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

Región VH Ab 969 VH de rata SEQ ID NO:11

QVTLKESGPG ILQPSQTLST TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPSGKGLEWL
ANIWWDDEKY YNPSLKNRLT ISKDTSNQQA FLKLTNVHTS DSATYYCARI
GPIKYPTAPY RYDFWGPST MVTVS

Región VH Ab 969 VH de rata SEQ ID NO:12

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac
cctcagtcctg acttgcaactt tctctgggtt ttcactgacc acttatggta
tgggtgtggg ctggattcgt cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg

FIGURA 1A

Secuencia Ab CA019_969

CDR-L1

LASEDIYDNLA SEQ ID NO:1

CDRL2

YASSLQD SEQ ID NO:2

CDR-L3

LQDSEYPWT SEQ ID NO:3

CDR-H1

GFSLTITYGMGVG SEQ ID NO:4

CDR-H2

NIWWDDDKYYNPSLKN SEQ ID NO:5

CDR-H3

IGPIKYPTAPYRYFDF SEQ ID NO:6