

ANTICUERPOS ANTI-GM-CSF Y USOS DE LOS MISMOS

ANTECEDENTES

[0001] El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF o GM-CSF), también conocido como factor estimulante de colonias 2 (CSF2), es una glicoproteína monomérica secretada por macrófagos, células T, mastocitos, células NK, células endoteliales y fibroblastos que funcionan como una citoquina. Los análogos farmacéuticos del GM-CSF natural también se conocen como sargramostim y molgramostim. A diferencia del factor estimulante de colonias de granulocitos, que promueve específicamente la proliferación y maduración de los neutrófilos, el GM-CSF afecta a más tipos de células, especialmente macrófagos y eosinófilos.

[0002] GM-CSF es una glicoproteína monomérica que funciona como una citoquina. GM-CSF estimula a las células madre para producir granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos. Los monocitos salen de la circulación y migran hacia el tejido celular, donde maduran hasta convertirse en macrófagos y células dendríticas. Por lo tanto, es parte de la cascada inmune/inflamatoria, por lo cual la activación de un pequeño número de macrófagos puede conducir rápidamente a un aumento en su número, un proceso crucial para combatir la infección. GM-CSF también tiene algunos efectos en las células maduras del sistema inmunológico. Estos incluyen, por ejemplo, inhibir la migración de neutrófilos y causar una alteración de los receptores expresados en la superficie de las células.

[0003] GM-CSF realiza la señalización a través de un transductor de señal y un activador de transcripción, STAT5. En macrófagos, también se ha demostrado que la señalización se da a través de STAT3. La citoquina activa los macrófagos para inhibir la supervivencia de los hongos. Induce la privación de zinc libre intracelular y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno que culminan en la inanición y toxicidad del zinc por hongos. Por lo tanto, GM-CSF facilita el desarrollo del sistema inmunológico y promueve la defensa contra las infecciones. GM-CSF también desempeña un papel en el desarrollo embrionario al funcionar como una embriocina producida por el tracto reproductivo.

[0004] El GM-CSF se fabrica utilizando tecnología de ADN recombinante y se comercializa como una proteína terapéutica llamada molgramostim o, cuando la proteína se expresa en células de levadura, sargramostim. Es utilizado como un medicamento para

estimular la producción de glóbulos blancos y, por lo tanto, prevenir la neutropenia después de la quimioterapia. El GM-CSF también se ha evaluado en ensayos clínicos por su potencial como adyuvante de vacunas en pacientes infectados por el VIH.

[0005] La inhibición de GM-CSF, por el contrario, puede ser útil para tratar enfermedades tales como enfermedades inflamatorias y trastornos autoinmunes incluyendo artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM) y psoriasis en placas. La inhibición de GM-CSF también puede ser útil para tratar el cáncer.

RESUMEN

[0006] La presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-GM-CSF que tiene una alta afinidad de unión a proteínas GM-CSF humanas y que tiene potentes actividades que inhiben la unión entre GM-CSF y su receptor. Estos anticuerpos anti-GM-CSF son útiles para fines terapéuticos tales como el tratamiento de diversos tipos de enfermedades inflamatorias, trastornos autoinmunes y cánceres, y también pueden ser usados para fines de diagnóstico y pronóstico.

[0007] La presente divulgación, proporciona en una realización un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo tiene especificidad a una proteína GM-CSF humana y comprende una VH CDR1 de ID de SEC NO: 1, una VH CDR2 de ID de SEC No: 2, una VH CDR3 de ID de SEC No: 3, una VL CDR1 de ID de SEC No: 4, una VL CDR2 de ID de SEC No: 5 y una VL CDR3 de ID de SEC No: 6. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende además una región constante de cadena pesada, una región constante de cadena liviana, una región Fc, o la combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la región constante de cadena liviana es una región constante de cadena kappa o lambda. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es de un isotipo de IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. En algunas realizaciones, el isotipo es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.

[0008] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende a su vez uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) Glu en la posición 1, (b) Arg en

la posición 98, (c) Ser en la posición 72, (d) Ala en la posición 68, (e) Leu en la posición 70, Ile en la posición 48, (g) Asp en la posición 26, y (h) Leu en la posición 29, de acuerdo con la numeración de Kabat y combinaciones de las mismas.

[0009] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende un fragmento de DYTTLT (ID de SEC No: 42) o GYTFT (ID de SEC No: 43) que comienza en la posición 26 de acuerdo con la numeración de Kabat.

[0010] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena liviana que comprende a su vez uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) Ala en la posición 46, (b) Asp en la posición 60, (c) Asp en la posición 70, (d) Ser en la posición 43, y (f) Phe en la posición 87, de acuerdo con la numeración de Kabat y combinaciones de las mismas.

[0011] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende a su vez una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC No: 8-17, o un péptido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC No: 8-17. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC No: 11, 14 o 17.

[0012] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena liviana que comprende a su vez una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en ID de SEC No: 19-22, o un péptido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC No: 19-22. En algunas realizaciones, la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 19 o 22.

[0013] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 14 y la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 22. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo biespecífico o un fragmento variable de cadena única.

[0014] La presente divulgación proporciona en una realización un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, donde el anticuerpo o fragmento del mismo tiene una especificidad a una proteína GM-CSF humana y comprende una VH CDR1 de ID de SEC NO: 23, una VH CDR2 de ID de SEC No: 24, una VH CDR3 de ID de SEC No: 25, una VL CDR1 de ID de SEC No: 26, una VL CDR2 de ID de SEC No: 27 y una VL CDR3 de ID de SEC No: 28. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende además una región constante de cadena pesada, una región constante de cadena liviana, una región Fc, o la combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la región constante de cadena liviana es una región constante de cadena kappa o lambda. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es de un isotipo de IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. En algunas realizaciones, el isotipo es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.

[0015] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende a su vez uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 o T30, según la numeración de Kabat y combinaciones de los mismos.

[0016] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende un fragmento de GYIFT (ID de SEC No: 44), GYIFS (ID de SEC No: 45), o GGTFSS (ID de SEC No: 46) que comienza en la posición 26 según la numeración de Kabat.

[0017] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena liviana que comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: V48, D57, Q70 o S43, de acuerdo con la numeración de Kabat, y combinaciones de los mismos.

[0018] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende a su vez una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC No: 29-35, o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC No: 29-35. En algunas realizaciones, la región

variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 34 o 35.

[0019] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena liviana que comprende a su vez una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC No: 36-41, o un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC No: 36-41. En algunas realizaciones, la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 38 o 39.

[0020] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 34 y la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 38. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 35 y la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 39. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo biespecífico o un fragmento variable de cadena sencilla.

[0021] En una realización, se proporciona una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporciona, en una realización, una célula aislada que comprende uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente divulgación.

[0022] En una realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune en un paciente que lo necesite, que comprende la administración del anticuerpo o fragmento del mismo al paciente, o una composición de la presente divulgación. También se proporcionan usos del anticuerpo o fragmento del mismo, o una composición para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune.

[0023] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Addison, la aterosclerosis, la espondilitis anquilosante, la artritis, la osteoartritis (OA), la artritis reumatoide (AR), la artritis psoriásica (AP), la espondilitis anquilosante, asma,

aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de Crohn, colitis, dermatitis, diverticulitis, fibromialgia, hepatitis, síndrome del intestino irritable (SII), lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis, enfermedad de Parkinson (EP), vasculitis y colitis ulcerosa.

[0024] También se proporciona en una realización, un método para reducir o aliviar el dolor en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente divulgación.

[0025] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección autoinmune se selecciona del grupo que consiste en alopecia areata, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, dermatomiositis, diabetes (tipo 1), enfermedad celíaca, artritis idiopática juvenil autoinmune, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia gravis, miocarditis autoinmune, esclerosis múltiple, pénfigo/pénfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoidea, esclerodermia/esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, lupus sistémico eritematoso, tiroiditis autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, uveítis autoinmune, vitiligo y granulomatosis con poliangitis (de Wegener).

[0026] También se proporciona un método para detectar la expresión de GM-CSF en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo o fragmento del mismo bajo condiciones para que el anticuerpo o fragmento del mismo se una al GM-CSF, y detectar la unión que indica la expresión de GM-CSF en la muestra.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

[0027] La **FIGURA 1** muestra los resultados de los ensayos de unión ELISA confirmatorios para seleccionar clones de hibridoma primarios para la subclonación.

[0028] La **FIGURA 2** muestra los resultados de los ensayos de unión ELISA confirmatorios para seleccionar clones de hibridoma primarios para la subclonación.

[0029] La **FIGURA 3** muestra la unión dependiente de la dosis de los anticuerpos de prueba al GM-CSF humano.

[0030] La **FIGURA 4** representa la unión cinética de los anticuerpos con GM-CSF humano recombinante.

[0031] La **FIGURA 5** muestra la inhibición dependiente de la dosis de la unión de GM-CSF al receptor alfa de GM-CSF por los anticuerpos.

[0032] La **FIGURA 6** muestra que los anticuerpos disminuyeron significativamente el nivel de activación de pSTAT5 inducida por GM-CSF.

[0033] La **FIGURA 7** muestra la inhibición de GM-CSF dependiente de la proliferación de TF-1 por los anticuerpos.

[0034] La **FIGURA 8** muestra que todos los anticuerpos humanizados demostraron una fuerte potencia de unión contra GM-CSF humano.

[0035] La **FIGURA 9** muestra que unos pocos anticuerpos humanizados mostraron una inhibición más fuerte de la proliferación de TF-1.

[0036] La **FIGURA 10** muestra que los anticuerpos probados bloquearon efectivamente la señalización de pSTAT5.

[0037] La **FIGURA 11** muestra la unión dependiente de la dosis de los anticuerpos al rhesus GM-CSF.

[0038] La **FIGURA 12** traza los parámetros farmacocinéticos de Hu23F4-27.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0039] Se debe tener en cuenta que el término “una” entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que “un anticuerpo” representa uno o más anticuerpos. Así mismo, los términos “un”, “uno o más” y “al menos uno” se pueden usar indistintamente en este documento.

[0040] Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” pretende abarcar un “polipéptido” singular así como varios “polipéptidos”, y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término “polipéptido” se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, “proteína”, “cadena de

aminoácidos” o cualquier otro término utilizado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de “polipéptido”, y el término “polipéptido” se puede utilizar en lugar de, o intercambiabilmente con cualquiera de estos términos. El término “polipéptido” también pretende referirse a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, que incluyen, sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivarse de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluso por síntesis química.

[0041] El término “aislado” como se usa en este documento con respecto a las células, los ácidos nucleicos, como el ADN o el ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. El término “aislado” como se usa en el presente documento también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Además, se pretende que un “ácido nucleico aislado” incluya fragmentos de ácido nucleico que no se producen naturalmente como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término “aislado” también se usa en el presente documento para referirse a células o polipéptidos que están aislados de otras proteínas o tejidos celulares. Se pretende que los polipéptidos aislados abarquen tanto los polipéptidos purificados como los recombinantes.

[0042] Como se usa en el presente documento, el término “recombinante” en lo que se refiere a polipéptidos o polinucleótidos, comprende una forma del polipéptido o polinucleótido que no existe naturalmente, un ejemplo no limitante del mismo puede crearse combinando polinucleótidos o polipéptidos que normalmente no se producirían juntos.

[0043] “Homología” o “identidad” o “similitud” se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines de comparación.

Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las mismas. Una secuencia “no relacionada” o “no homóloga” comparte menos del 40% de identidad, aunque preferiblemente menos del 25% de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

[0044] Un polinucleótido o región polinucleotídica (o un polipéptido o región polipeptídica) tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) de “identidad de secuencia” a otra secuencia significa que, cuando están alineados, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Preferiblemente, se usan parámetros por defecto para la alineación. Un programa de alineación es BLAST, utilizando parámetros predeterminados. En particular, los programas son BLASTN y BLASTP, utilizando los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; expectativa = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = ALTA PUNTUACIÓN; Bases de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones GenBank CDS + SwissProtein + actualización de SP + PIR. Los polinucleótidos biológicamente equivalentes son aquellos que tienen el porcentaje de homología especificado anteriormente y que codifican un polipéptido que tiene la misma actividad biológica o similar.

[0045] El término “un ácido nucleico o polinucleótido equivalente” hace referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico o su complemento. Un homólogo de un ácido nucleico bicatenario pretende incluir ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos que tienen a su vez un cierto grado de homología con o con el complemento de los mismos. En un aspecto, los homólogos de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse con el ácido nucleico o su complemento. Asimismo, “un polipéptido equivalente” se refiere a un polipéptido que tiene cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia. En algunos aspectos, la identidad de secuencia es al menos

aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%. En algunos aspectos, el polipéptido o polinucleótido equivalente tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco adiciones, deleciones, sustituciones y sus combinaciones en comparación con el polipéptido o polinucleótido de referencia. En algunos aspectos, la secuencia equivalente conserva la actividad (por ejemplo, la unión al epítipo) o la estructura (por ejemplo, el puente salino) de la secuencia de referencia.

[0046] Las reacciones de hibridación se pueden realizar en condiciones de diferente “rigurosidad”. En general, una reacción de hibridación de baja rigurosidad se lleva a cabo a aproximadamente 40°C en aproximadamente 10 x SSC o una solución de fuerza iónica/temperatura equivalente. Una hibridación de rigurosidad moderada se realiza típicamente a aproximadamente 50°C en aproximadamente 6 x SSC, y una reacción de hibridación de alta rigurosidad generalmente se realiza a aproximadamente 60°C en aproximadamente 1 x SSC. Las reacciones de hibridación también pueden realizarse bajo “condiciones fisiológicas”, que son bien conocidas por las personas versadas en la materia. Un ejemplo no limitante de una condición fisiológica es la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la concentración de Mg^{2+} que se encuentran normalmente en una célula.

[0047] Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) en lugar de timina cuando el polinucleótido es ARN. Por lo tanto, el término "secuencia de polinucleótidos" es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética puede ingresarse en bases de datos en una computadora que tenga una unidad de procesamiento central y se utilice para aplicaciones de bioinformática como la genómica funcional y la búsqueda de homología. El término “polimorfismo” se refiere a la coexistencia de más de una forma de un gen o parte del mismo. Una porción de un gen de la cual hay al menos dos formas diferentes, es decir, dos secuencias de nucleótidos diferentes, se denomina “región polimórfica de un gen”. Una región polimórfica puede ser un nucleótido único cuya identidad difiere en diferentes alelos.

[0048] Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un

gen o fragmento de gen (por ejemplo una sonda, cebador, marca SAGE o EST), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosomal, ribozimas, ADNc, ARNbc, ARNip, mi-ARN, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones en la estructura del nucleótido se pueden impartir antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede ser además modificado después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcado. El término también se refiere tanto a moléculas de doble cadena como a moléculas cadena sencilla. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta divulgación que sea un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas complementarias monocatenarias conocidas o que se predican como constituyentes de la forma bicatenaria.

[0049] El término “codificar” tal como se aplica a los polinucleótidos, se refiere a un polinucleótido que se dice que “codifica” un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por aquellos versados en en la materia, puede ser transcrito y/o traducido para producir el ARNm para el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena con sentido contrario es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante puede deducirse del mismo.

[0050] Como se usa en el presente documento, un “anticuerpo” o “polipéptido de unión a antígeno” se refiere a un polipéptido o un complejo de polipéptido que reconoce específicamente y se une a un antígeno. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo y cualquier fragmento de unión a antígeno o una cadena sencilla del mismo. Por lo tanto, el término “anticuerpo” incluye cualquier proteína o molécula que contiene que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene actividad biológica de unión al antígeno. Ejemplos de tales incluyen, pero no se limitan a una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o liviana o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o liviana, una región constante de cadena pesada o cadena liviana, una región marco (FR), o cualquier porción de la misma, o al menos una porción de una proteína de unión.

[0051] Los términos “fragmento de anticuerpo” o “fragmento de unión a antígeno”, como se usan en este documento, son una porción de un anticuerpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. El término “fragmento de anticuerpo” incluye aptámeros, spieglmers y diacuerpos. El término “fragmento de anticuerpo” también incluye cualquier proteína sintética o genéticamente modificada que actúa como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo.

[0052] Un “fragmento variable de una cadena sencilla” o “ $scFv$ ” se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada (V_H) y liviana (V_L) de las inmunoglobulinas. En algunos aspectos, las regiones están conectadas con un péptido enlazador corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador puede ser rico en glicina para la flexibilidad, así como serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo N de la V_H con el extremo C de la V_L , o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador. Las moléculas de $ScFv$ son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente US 5,892,019.

[0053] El término anticuerpo abarca varias clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). La naturaleza de esta cadena es la que determina la “clase” del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgG_5 , etc. están bien caracterizadas y son conocidos porque confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente perceptibles para el experto en la materia en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la misma. Todas las clases de inmunoglobulina están claramente dentro del alcance de la presente divulgación, la siguiente discusión generalmente se dirigirá a la clase de IgG de moléculas de inmunoglobulina. Respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena liviana idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23,000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular entre 53,000 y 70,000. Las cuatro

cadena están unidas típicamente por enlaces disulfuro en una configuración en “Y” en la que las cadenas livianas se unen a las cadenas pesadas que comienzan en la boca de la “Y” y continúan a través de la región variable.

[0054] Los anticuerpos, polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión a epítopo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs con enlaces disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VK o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, desde anticuerpos anti-Id hasta anticuerpos LIGEROS descritos en este documento). Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

[0055] Las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda (K, λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con una cadena liviana kappa o lambda. En general, las cadenas livianas y pesadas están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de “cola” de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces covalentes de disulfuro o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, Células B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos se extienden desde un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena.

[0056] Tanto las cadenas livianas como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos “constante” y “variable” se usan funcionalmente. Respecto a esto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de cadena liviana (VK) y pesada (VH) determinen el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena liviana (CK) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al receptor Fc, la unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión a antígeno o del extremo amino del anticuerpo.

La parte extrema N es una región variable y en la parte extrema C es una región constante; los dominios CH3 y CK comprenden en realidad el término carboxi de las cadenas pesada y liviana, respectivamente.

[0057] Como se indicó anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a los epítomos en antígenos. Es decir, el dominio VK y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria de anticuerpo forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres CDRs en cada una de las cadenas VH y VK (es decir, CDR-H1, CDR- H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3). En algunos casos, por ejemplo, ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos o diseñadas a base de inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir solo en cadenas pesadas, sin cadenas livianas. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-448 (1993).

[0058] En los anticuerpos naturales, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias cortas y no contiguas de aminoácidos que están posicionadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno tal como el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un ambiente acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión a antígeno, denominados regiones "marco", muestran una menor variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de hoja beta y los CDR forman bucles que se conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la hoja. Por lo tanto, las regiones marco actúan para formar un andamio que proporciona el posicionamiento de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercatenarias y no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítomo en el antígeno inmunoreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítomo afín. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, para cualquier región variable de cadena liviana o pesada dada, ya que se han definido con precisión (véase "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., *et al.*, U.S.

Department of Health and Human Services, (1983); and Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

[0059] En el caso de que haya dos o más definiciones de un término que es usado y/o aceptado dentro de la técnica, la definición del término como se usa en el presente documento pretende incluir todos estos significados a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término “región determinante de la complementariedad” (“CDR”) para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de los polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. Esta región en particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las definiciones de CDR de acuerdo con Kabat y Chothia incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, se pretende que la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término como se define y se usa en este documento. Los residuos de aminoácidos apropiados que abarcan las CDRs como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen en la tabla que se presenta a continuación como una comparación. Los números exactos de residuos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Aquellos expertos versados en la materia pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0060] Kabat *et al.* también definió un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar inequívocamente este sistema de “numeración de Kabat” a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la secuencia en sí. Como se

usa en este documento, la “numeración de Kabat” se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983).

[0061] Además de la tabla anteriormente presentada, el sistema de numeración de Kabat describe las regiones CDR de la siguiente manera: CDR-H1 comienza en aproximadamente el aminoácido 31 (es decir, aproximadamente 9 residuos después del primer residuo de cisteína), incluye aproximadamente 5-7 aminoácidos, y termina en el siguiente residuo de triptófano. CDR-H2 comienza en el decimoquinto residuo después del final de CDR-H1, incluye aproximadamente 16-19 aminoácidos, y termina en el siguiente residuo de arginina o lisina. CDR-H3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo de aminoácido después del final de CDR-H2; incluye 3-25 aminoácidos; y termina en la secuencia W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido. La CDR-L1 comienza en aproximadamente el residuo 24 (es decir, después de un residuo de cisteína); incluye aproximadamente 10-17 residuos; y termina en el siguiente residuo de triptófano. CDR-L2 comienza en aproximadamente el decimosexto residuo después del final de CDR-L1 e incluye aproximadamente 7 residuos. CDR-L3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo después del final de CDR-L2 (es decir, después de un residuo de cisteína); incluye aproximadamente 7-11 residuos y termina en la secuencia F o W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido.

[0062] Los anticuerpos divulgados en este documento pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, de conejo, de cabra, de conejillo de indias, de camello, de llama, de caballo o de pollo. En otra realización, la región variable puede tener un origen conditio (por ejemplo, de tiburón).

[0063] Como se usa en el presente documento, el término “región constante de cadena pesada” incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio de bisagra (por ejemplo, región de bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno para uso en la divulgación puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un

dominio bisagra, y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la divulgación comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, un anticuerpo para su uso en la divulgación puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Como se expuso anteriormente, un experto en la materia entenderá que la región constante de la cadena pesada puede modificarse de modo que varíe en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina que se produce de forma natural.

[0064] La región constante de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento puede derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una región constante de la cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG₁ y una región bisagra derivada de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una región constante de la cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₄.

[0065] Como se usa en el presente documento, el término “región constante de cadena liviana” incluye secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena liviana del anticuerpo. Preferiblemente, la región constante de la cadena liviana comprende al menos uno de un dominio kappa constante o un dominio lambda constante.

[0066] Una “pareja de cadena liviana-cadena pesada” hace referencia a la colección de una cadena liviana y una cadena pesada que puede formar un dímero a través de un enlace disulfuro entre el dominio CL de la cadena liviana y el dominio CH1 de la cadena pesada.

[0067] Como se indicó anteriormente, las estructuras de las subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Como se usa en el presente documento, el término “dominio VH” incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término

“dominio CH1” incluye el primer dominio de región constante (la mayoría amino terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y es amino terminal a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

[0068] Como se usa en el presente documento, el término “dominio CH2” incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983). El dominio CH2 es único porque no está estrechamente asociado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidrato ramificadas unidas a N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

[0069] Como se usa en el presente documento, el término “región bisagra” incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región de bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión al antígeno N-terminales se muevan independientemente. Las regiones de bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios de bisagra superior, medio e inferior (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161: 4083 (1998)).

[0070] Como se usa en el presente documento, el término “enlace disulfuro” incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace disulfuro o puente con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG de origen natural, las regiones CH1 y CK están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración Kabat (posición 226 o 229, según el sistema de numeración de la UE).

[0071] Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo quimérico” se considerará que significa cualquier anticuerpo en el que la región o sitio inmunoreactivo se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta,

parcial o modificada de acuerdo con la presente divulgación) se obtiene de una segunda especie. En ciertas realizaciones, la región o sitio de unión será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana.

[0072] Como se usa en el presente, el “porcentaje de humanización” se calcula determinando el número de diferencias de aminoácidos del marco (es decir, la diferencia sin CDR) entre el dominio humanizado y el dominio de la línea germinal, restando ese número del número total de aminoácidos, y luego dividiéndolo por el número total de aminoácidos y multiplicándolo por 100.

[0073] Por “específicamente se une” o “tiene especificidad a”, generalmente se entiende que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión conlleva cierta complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo se “une específicamente” a un epítipo cuando se une a ese epítipo a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado. El término “especificidad” se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa por la cual un cierto anticuerpo se une a un cierto epítipo. Por ejemplo, se puede decir que el anticuerpo “A” puede tener una especificidad más alta para un epítipo determinado que el anticuerpo “B”, o se puede decir que el anticuerpo “A” puede unirse al epítipo “C” con una especificidad más alta que la que tiene para el epítipo relacionado “D”.

[0074] Como se usa en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” hacen referencia tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como la progresión de una enfermedad autoinmune. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejoría o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. El término “tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en el caso en el que no se reciba tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno, o aquellos en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

[0075] Por “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero” se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para quien se desea un diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoológico, deportes o mascotas, como perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, etc.

[0076] Como se usa en el presente documento, frases tales como “a un paciente que necesita tratamiento” o “un sujeto que necesita tratamiento” incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo o composición de la presente divulgación utilizada, por ejemplo, para detección, para un procedimiento de diagnóstico y/o para tratamiento.

Anticuerpos anti-GM-CSF

[0077] La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-GM-CSF con alta afinidad a la proteína humana GM-CSF. Los anticuerpos probados mostraron una potente unión y actividades inhibitorias, y son útiles para usos terapéuticos y de diagnóstico. Además de los anticuerpos murinos originales, los humanizados también mostraron una fuerte afinidad de unión con rhesus GM-CSF y GM-CSF humano, cuya unión bloqueó la unión de GM-CSF’ al receptor alfa de GM-CSF y bloqueó la señalización de pSTAT5 inducida por GM-CSF, y por último, inhibió la proliferación de TF-1 dependiente de GM-CSF.

[0078] De acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo que incluye los dominios variables de cadena pesada y liviana con las regiones CDR como se definen en la ID de SEC No: 1-6 o la ID de SEC No: 23-28, como se muestra a continuación.

Tabla 1a. Secuencias de las regiones CDR de 23F4.

Nombre	Secuencias	ID de SEC No:
VH CDR1	SHYLH	1
VH CDR2	WIFPGDDKTKYNEKFKG	2
VH CDR3	GTKYLNWNFDV	3
VL CDR1	KANQNVGTTLA	4
VL CDR2	SASYRYS	5
VL CDR3	HQYTTYPLT	6

Tabla 1b. Secuencias de las regiones CDR de 50C5

Nombre	Secuencias	ID de SEC No:
VH CDR1	PYSIH	23
VH CDR2	YINPSTGYIEYNQHFKD	24
VH CDR3	GGDYEGYFDY	25
VL CDR1	RLNENIYSFLA	26
VL CDR2	NAETLAE	27
VL CDR3	QQHYGTPYT	28

[0079] Como se demostró en los ejemplos experimentales, los anticuerpos que contenían estas regiones CDR, ya sea de ratón, humanizados o quiméricos, tenían una potente unión al GM-CSF y actividades inhibitorias. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-GM-CSF de la presente divulgación incluye la CDR de VH y VL como se indica en la Tabla 1a-b, con una, dos o tres modificaciones adicionales. Dichas modificaciones pueden ser la adición, eliminación o sustitución de aminoácidos.

[0080] En algunas realizaciones, la modificación es la sustitución en no más de un residuo de cada una de las CDRs. En algunas realizaciones, la modificación es la sustitución en uno, dos o tres residuos. En una realización, la modificación es la sustitución en uno de los residuos. Tales sustituciones, en algunas realizaciones, son sustituciones conservativas.

[0081] Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales de cadena ramificada (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina se reemplaza preferiblemente con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. En otra realización, una cadena de aminoácidos puede reemplazarse con una cadena

estructuralmente similar que difiere en orden y/o composición de los miembros de la familia de cadenas laterales.

[0082] Los ejemplos no limitantes de sustituciones conservativas de aminoácidos se proporcionan en la tabla a continuación, donde una puntuación de similitud de 0 o superior indica una sustitución conservativa entre los dos aminoácidos.

Tabla 2. Matriz de similitud de aminoácidos

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Tabla 3. Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Para aminoácido	el	Sustitución por
Alanina		D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina		D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Asparagina		D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Ácido aspártico		D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína		D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Glutamina		D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico		D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina		Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala

Isoleucina	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Lisina	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Metionina	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Prolina	D-Pro
Serina	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Tirosina	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Valina	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0083] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento del mismo incluye no más de uno, no más de dos, o no más de tres de las sustituciones presentadas anteriormente.

[0084] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo tiene especificidad a una proteína GM-CSF humana y comprende una VH CDR1 de ID de SEC NO: 1, una VH CDR2 de ID de SEC NO: 2, una VH CDR3 de ID de SEC NO: 3, una VL CDR1 de ID de SEC No: 4, una VL CDR2 de ID de SEC No: 5 y una VL CDR3 de ID de SEC No: 6. En la ID de SEC No: 7-17 se proporcionan ejemplos no limitantes de VH, de los cuales la ID de SEC No: 7 es la VH del ratón y la ID de SEC No: 8-17 son las humanizadas. Además, estos VH humanizados incluyen una o más mutaciones secundarias a la versión del ratón. Del mismo modo, se proporcionan ejemplos no limitantes de VL (VK) en la ID de SEC No: 18-22. La ID de SEC No: 18 es una secuencia de ratón y la ID de SEC No: 19-22 son secuencias humanizadas, entre las cuales la ID de SEC No: 20-22 incluye una o más mutaciones secundarias, como se muestra en los ejemplos.

[0085] Se muestra que las mutaciones secundarias son útiles para retener ciertas características de los anticuerpos anti-GM-CSF. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-GM-CSF de la presente divulgación, en particular los humanos o humanizados, incluyen una o más de las mutaciones secundarias. En algunas realizaciones, la mutación secundaria VH (es decir, el aminoácido incluido en la posición especificada) es una o más seleccionados de (a) Glu en la posición 1 (E1), (b) Arg en la posición 98 (R98), (c) Ser en la posición 72 (S72), (d) Ala en la posición 68 (A68), (e) Leu en la

posición 70 (L70), (f) Ile en la posición 48 (I48), (g) Asp en la posición 26 (D26) y (h) Leu en la posición 29 (L29), de acuerdo con la numeración de Kabat y combinaciones de los mismos.

[0086] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos la mutación secundaria E1 de VH. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias E1 y R98 de VH. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias E1 de VH y otra como se enumeró anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos el grupo de mutación secundaria VH (E1, R98 y S72), (E1, R98, S72 y A68), (E1, R98, S72, A68, L70 y I48), (E1, R98, S72, A68, L70, I48, D26 y L29), (E1 y S72), (E1, S72 y L70), (E1, S72, L70, I48 y A68), (E1, S72, L70, I48, A68, D26 y L29).

[0087] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende un fragmento de DYTTLT (ID de SEC No: 42) o GYTFTT (ID de SEC No: 43) en el extremo N terminal de la CDR1, es decir, que comienza en la posición 26 según la numeración de Kabat. En una realización, la región variable de cadena pesada comprende DYTTLT (ID de SEC No: 42). En una realización, la región variable de cadena pesada comprende GYTFTT (ID de SEC No: 43).

[0088] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye una o más de las mutaciones secundarias. En algunas realizaciones, la mutación secundaria VL es una o más seleccionadas de (a) Ala en la posición 46 (A46), (b) Asp en la posición 60 (D60), (c) Asp en la posición 70 (D70), (d) Ser en la posición 43 (S43), y (f) Phe en la posición 87 (F87), de acuerdo con la numeración de Kabat y combinaciones de los mismos.

[0089] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos dos, tres o cuatro de las mutaciones secundarias VL A46, D60, D70, S43 o F87. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VL A46. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VL A46 y D60 y otra como se menciona anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos el grupo de mutación secundaria VL (A46, D60 y D70) o (A46, D60, D70, S43 y F87).

[0090] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VH (E1, R98, S72, A68, L70 e I48) y no mutaciones secundarias VL. En

algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VH (E1, S72, L70, I48, A68, D26 y L29) y no mutaciones secundarias VL. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VH (E1 y S72) y mutaciones secundarias VL (A46, D60, D70, S43 y F87).

[0091] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF de la presente divulgación incluye una VH de ID de SEC NO: 8-17, y un VL de ID de SEC NO: 19-22, o sus respectivos equivalentes biológicos. Un equivalente biológico de una VH o VL es una secuencia que incluye los aminoácidos designados y tiene una identidad de secuencia general del 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%. Un equivalente biológico de ID de SEC NO: 10, por lo tanto, puede ser una VH que tenga una identidad de secuencia general del 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con la ID de SEC No: 10, pero que conserva las CDRs (ID de SEC No: 1-3 o sus variantes), y opcionalmente retiene una o más, o todas las mutaciones secundarias.

[0092] En una realización, la VH tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 11 y la VL tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 19. En una realización, la VH tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 17 y la VL tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 19. En una realización, la VH tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 11 y la VL tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 22. Cada una de las secuencias citadas, se observa, también pueden ser sustituidas con sus equivalentes biológicos.

[0093] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo tiene especificidad a una proteína GM-CSF humana y comprende una VH CDR1 de ID de SEC NO: 23, una VH CDR2 de ID de SEC NO: 24, una VH CDR3 de ID de SEC NO: 25, una VL CDR1 de ID de SEC No: 26, una VL CDR2 de ID de SEC No: 27 y una VL CDR3 de ID de SEC No: 28. En las ID de SEC No: 29-35 se proporcionan ejemplos no limitantes de VH, de los cuales ID de SEC No: 29 es la VH del ratón y ID de SEC No: 30-35 son las humanizados. Además, estas VH humanizadas incluyen una o más mutaciones secundarias a la versión del ratón. Del mismo modo, los ejemplos no limitantes de VL (VK) se proporcionan en la ID de SEC No: 36-41. La ID de SEC No: 36 es una secuencia de ratón, y la ID de SEC No: 37-41 son secuencias humanizadas, entre las cuales la ID de SEC No: 38-41 incluye una o más mutaciones secundarias, como se muestra en los ejemplos.

[0094] Se muestra que las mutaciones secundarias son útiles para retener ciertas características de los anticuerpos anti-GM-CSF. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-GM-CSF de la presente divulgación, en particular los humanos o humanizados, incluyen una o más de las mutaciones secundarias. En algunas realizaciones, la mutación secundaria VH (es decir, el aminoácido incluido en la posición especificada) es una o más seleccionadas de E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 o T30, de acuerdo con la numeración de Kabat y las combinaciones de las mismas.

[0095] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos la mutación secundaria VH de E1. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VH de E1 y R84. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VH de E1 y otra como se mencionó anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos el grupo de mutación secundaria VH (E1), (E1 y R84), (E1, R84, Y27 e I28), (E1, R84, Y27, I28 e I48), (E1, R84, Y27, I28, I48, T68 y L70), o (E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 y T30).

[0096] En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende un fragmento de GYIFT (ID de SEC No: 44), GYIFS (ID de SEC No: 45) o GGTFSS (ID de SEC No: 46) en el extremo N terminal de CDR1, es decir, a partir de la posición 26 según la numeración de Kabat. En una realización, la región variable de cadena pesada comprende GYIFT (ID de SEC No: 44). En una realización, la región variable de cadena pesada comprende GYIFS (ID de SEC No: 45). En una realización, la región variable de cadena pesada comprende GGTFSS (ID de SEC No: 46).

[0097] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye una o más de las mutaciones secundarias. En algunas realizaciones, la mutación secundaria de VL es una o más seleccionadas de V48, D57, Q70 o S43, según la numeración de Kabat y las combinaciones de las mismas.

[0098] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos dos, tres o cuatro de las mutaciones secundarias VL de V48, D57, Q70 o S43. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos una mutación secundaria VL de V48. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VL de V48 y D57 y otra como se indica anteriormente. En algunas

realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos el grupo de mutación secundaria VL de (V48), (V48 y D57), (V48, D57 y Q70) o (V48, D57, Q70 y S43).

[0099] En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VH (E1, R84, Y27, I28, I48, T68 y L70) y mutación secundaria VL de V48. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado incluye al menos mutaciones secundarias VH (E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 y T30) y mutaciones secundarias VL (V48 y D57).

[0100] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-GM-CSF de la presente divulgación incluye una VH de ID de SEC NO: 30-35, y una VL de ID de SEC NO: 37-41, o sus respectivos equivalentes biológicos. Un equivalente biológico de un VH o VL es una secuencia que incluye los aminoácidos designados que tiene una identidad de secuencia general del 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%. Un equivalente biológico de ID de SEC NO: 35, por lo tanto, puede ser un VH que tenga una identidad de secuencia general del 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con la ID de SEC No: 35, pero conserva las CDRs (ID de SEC No: 23-25 o sus variantes), y opcionalmente retiene una o más, o todas las mutaciones secundarias.

[0101] En una realización, la VH tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 34 y la VL tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 38. En una realización, la VH tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 35 y la VL tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC NO: 39. Se observa que cada una de las secuencias citadas también puede ser sustituida por sus equivalentes biológicos.

[0102] Una persona versada en la materia también entenderá que los anticuerpos como se describen en el presente documento pueden modificarse de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión natural del que derivan. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o aminoácidos derivada de una proteína designada puede ser similar, por ejemplo, tener un cierto porcentaje de identidad con la secuencia de inicio, es decir, puede ser 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a la secuencia de inicio.

[0103] En algunas realizaciones los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación pueden ser anticuerpos o fragmentos monoespecíficos o biespecíficos. Para un anticuerpo biespecífico, la otra especificidad puede ser un epítipo objetivo diferente de GM-CSF o

una proteína objetivo diferente que sea útil para un uso particular, por ejemplo, uso terapéutico. En un aspecto, la proteína objetivo es una citoquina tal como TNF-alfa, IL-6, IL-1 e IL-17. En otro aspecto, la proteína objetivo es una quimioquina, como CCL2, CXCL12 y CXCL13. En otro aspecto, la proteína objetivo es una proteína de la superficie celular, como CD3, CSF-1R, CD20 y CD73.

[0104] En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más fragmentos que normalmente no están asociados a un anticuerpo. Las modificaciones ejemplares se describen a continuación con más detalle. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una secuencia enlazadora flexible, o puede modificarse para agregar un fragmento funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o una etiqueta).

[0105] Los anticuerpos, variantes o derivados de los mismos de la divulgación incluyen derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una al epítipo. A manera de ejemplo, pero no de limitación, los anticuerpos pueden modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos conocidos de protección/bloqueo, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[0106] En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser conjugados o conectados por otros medios a otra molécula para formar una molécula a bifuncional. La segunda molécula puede ser una de agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, o PEG. Algunos ejemplos no limitantes son citoquinas u otros factores solubles tales como IL-10, IL-25, IL-27, IL-33, IL-35, and IL-36. También se proveen en algunas realizaciones conjugados de anticuerpos que incluyen un anticuerpo o fragmento de la presente revelación y un fármaco de molécula pequeña.

[0107] Los anticuerpos pueden conjugarse o fusionarse con un agente terapéutico, que puede incluir marcadores detectables tales como marcadores radiactivos, un inmunomodulador, una hormona, una enzima, un oligonucleótido, un agente terapéutico fotoactivo o de diagnóstico, un agente citotóxico, que puede ser un fármaco o una toxina, un agente potenciador del ultrasonido, un marcador no radiactivo, una combinación de los mismos y otros agentes conocidos en la técnica.

[0108] Los anticuerpos se pueden marcar de forma detectable mediante su acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del polipéptido de unión al antígeno marcado con quimioluminiscencia se determina luego detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos quimioluminiscentes para marcar particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

[0109] Los anticuerpos también pueden marcarse de forma detectable utilizando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie de lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las técnicas para conjugar diversos fragmentos con un anticuerpo son bien conocidas, véase por ejemplo, Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery”, en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), y Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Polinucleótidos Que Codifican Los Anticuerpos Y Métodos De Preparación de los Mismos

[0110] La presente descripción también proporciona polinucleótidos aislados o moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, variantes o derivados de los mismos de la divulgación. Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar todas las regiones variables de cadena liviana y pesada de los polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótido separadas. Además, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar porciones de las regiones variables de cadena pesada y liviana de los polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótido separadas.

[0111] Los métodos para producir anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, tanto la región variable como la constante de los polipéptidos de unión a antígeno de la presente divulgación son completamente humanas. Pueden prepararse anticuerpos completamente humanos usando técnicas descritas en la técnica y como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos completamente humanos contra un antígeno específico administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos loci endógenos se han desactivado. Técnicas ejemplares que se pueden usar para hacer tales anticuerpos se describen en las patentes de los Estados Unidos 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140 que se incorporan por referencia en su totalidad.

[0112] En ciertas realizaciones, los anticuerpos preparados no provocarán una respuesta inmune perjudicial en el animal a tratar, por ejemplo, en un ser humano. En una realización, los polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la divulgación son modificados para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser humanizados, primatizados, desinmunizados o se pueden producir anticuerpos quiméricos. Estos tipos de anticuerpos se derivan de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo murino o de primate, que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo original, pero que es menos inmunogénico en humanos. Esto se puede lograr mediante diversos métodos, que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos completos

en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar al menos una parte de una o más de las regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDRs) en una estructura humana y regiones constantes con o sin retención de residuos del marco crítico; o (c) trasplantar la totalidad de los dominios variables no humanos, pero “encubrirlos” con una sección similar a la humana mediante el reemplazo de los residuos de la superficie. Tales métodos se describen en Morrison *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 57:6851-6855 (1984); Morrison *et al.*, *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 25:489 - 498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31: 169-217 (1994), y las siguientes patentes de Estados Unidos: 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762, y 6,190,370, todas las cuales se incorporan como referencia en su totalidad en el presente documento.

[0113] La desinmunización también se puede usar para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en este documento, el término “desinmunización” incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítomos de células T (véase, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud Internacional No.: WO/9852976 A1 y WO/0034317 A2). Por ejemplo, se analizan las secuencias variables de la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo de partida y se crea un “mapa” del epítomo de células T humanas de cada región V que muestra la ubicación de los epítomos en relación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítomos de células T individuales del mapa de epítomos de células T son analizados para identificar sustituciones alternativas de aminoácidos con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseñan unas secuencias alternativas de variables pesadas y livianas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en un rango de polipéptidos de unión. Normalmente, entre 12 y 24 variantes de anticuerpos son generadas y analizadas para determinar su unión y/o función. Los genes completos de cadena pesada y liviana que comprenden regiones modificadas variables y constantes humanas se clonan luego en vectores de expresión y los plásmidos subsiguientes se introducen en líneas celulares para la producción de un anticuerpo completo. Luego se comparan los anticuerpos en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

[0114] La especificidad de unión de los polipéptidos de unión a antígeno de la presente divulgación puede ser determinada mediante ensayos *in vitro* tales como

inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

[0115] Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de unidades de una sola cadena (Patente de Estados Unidos 4,694,778; Bird, *Science* 242:423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55:5879-5883 (1988) y Ward *et al.*, *Nature* 334:544-554 (1989)) pueden adaptarse para producir unidades de cadena sencilla de la presente descripción. Las unidades de una sola cadena se forman uniendo los fragmentos de las cadenas pesada y liviana de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un péptido de fusión de una sola cadena. También se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242:1038-1041 (1988)).

[0116] Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv de cadena única (scFvs) y anticuerpos incluyen los descritos en las Patentes de Estados Unidos 4,946,778 y 5,258,498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA* 90:1995-1999(1993); y Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988). Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de anticuerpos en humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la materia. Véase por ejemplo, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202 (1989); Patente de Estados Unidos 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397, que se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento.

[0117] Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo derivadas de un anticuerpo de especie no humana que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos del marco en las regiones del marco humano se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión del antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican por medio de métodos bien conocidos en la técnica,

por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de la CDR y los residuos marco para identificar residuos marco importantes para la unión de antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Véase por ejemplo, Queen *et al.*, Patente de Estados Unidos 5,585,089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988), que se incorporan aquí como referencia en su totalidad). Los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una variedad de técnicas conocidas en la materia, que incluyen por ejemplo, injertos de CDR (EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de Estados Unidos 5,225,539; 5,530,101 y 5,585,089), recubrimiento (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA* 91:969-973 (1994)), y la combinación de cadenas (Patente de Estados Unidos 5,565,332, que se incorpora por referencia en su totalidad).

[0118] Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante una variedad de métodos conocidos en la materia, incluyendo métodos de presentación de fagos que utilizan bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también, Patentes de Estados Unidos 4,444,887 y 4,716,111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741; cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad en el presente documento.

[0119] Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina humanos de cadena pesada y liviana pueden introducirse aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. De manera alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y liviana. Los genes de inmunoglobulina de ratón de cadena pesada y liviana pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la eliminación homocigótica de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían para

producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido objetivo deseado. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B, y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, utilizando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para obtener una descripción general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, consulte Lonberg y Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, y anticuerpos monoclonales humanos, y protocolos para producir dichos anticuerpos, véase por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; Patente de Estados Unidos 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318 y 5,939,598, que se incorporan por referencia en su totalidad en el presente documento. Además, compañías como Abgenix, Inc. (Freemont, California) y GenPharm (San José, California) pueden participar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

[0120] Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado también se pueden generar usando una técnica denominada “selección guiada”. En este enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers *et al.*, *Bio / Technology* 72:899-903 (1988). Véase también la Patente de Estados Unidos NO: 5,565,332, que se incorpora como referencia en su totalidad).

[0121] En otra realización, el ADN que codifica anticuerpos monoclonales deseados puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y livianas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas, sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped procarióticas o eucariotas, como las células de *E. coli*, las células COS de simio,

las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o las células de mieloma que no producen inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético como se describe en el presente documento) se puede usar para clonar secuencias de región variable y constante para la fabricación de anticuerpos como se describe en Newman *et al.*, Patente de Estados Unidos No. 5,658,570, presentada el 25 de enero de 1995, que se incorpora en el presente documento como referencia. Esencialmente, esto implica la extracción de ARN de las células seleccionadas, la conversión a ADNc y la amplificación mediante PCR utilizando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este propósito también se describen en la Patentes de Estados Unidos No. 5,658,570. Como se explicará con más detalle a continuación, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden crecer en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

[0122] Adicionalmente, usando técnicas de ADN recombinante de rutina, una o más de las CDRs de los polipéptidos de unión a antígeno de la presente divulgación, pueden insertarse dentro de regiones marco, por ejemplo, en regiones marco humanas para humanizar un anticuerpo no humano. Las regiones marco pueden ser naturales o regiones marco de consenso, y preferiblemente regiones marco humanas (véase por ejemplo, Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998) para una lista de regiones marco humanas). Preferiblemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y las CDRs codifica un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de un polipéptido deseado, por ejemplo, LIGHT. Preferiblemente, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones marco, y, preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, tales métodos pueden usarse para hacer sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intra cadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracadena. Otras alteraciones del polinucleótido están abarcadas por la presente divulgación y dentro de la experiencia de la técnica.

[0123] Además, se pueden usar las técnicas que se desarrollaron para la producción de “anticuerpos quiméricos” (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 372: 604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314:452-454 (1985)) mediante el empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón, de especificidad de antígeno apropiada, junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad

biológica apropiada. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

[0124] Otro medio altamente eficiente para generar anticuerpos recombinantes se describe en Newman, *Biotechnology* 10:1455-1460 (1992). Específicamente, esta técnica da como resultado la generación de anticuerpos primatizados que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Esta referencia se incorpora como referencia en su totalidad en el presente documento. Además, esta técnica también se describe en las Patentes de Estados Unidos 5,658,570; 5,693,780 y 5,756,096, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia.

[0125] Alternativamente, las líneas celulares productoras de anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. Respecto a lo anterior, las técnicas adecuadas para su uso en la divulgación como se describe a continuación se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates y Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), las cuales se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad, incluidos los suplementos.

[0126] Adicionalmente, se pueden usar técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente divulgación, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR, que dan lugar a sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluidos los derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos en relación con la región variable de cadena pesada de referencia, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, región variable de cadena liviana, CDR-L1, CDR-L2 o CDR-L3. Alternativamente, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente

a lo largo de toda o parte de la secuencia codificadora, como por ejemplo mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden seleccionarse para determinar la actividad biológica para así identificar los mutantes que retienen la actividad.

Métodos De Tratamiento Y Usos

[0127] Como se describe en el presente documento, los anticuerpos, variantes o derivados de la presente divulgación se pueden usar en ciertos métodos de tratamiento y diagnóstico.

[0128] La presente divulgación está dirigida además a terapias basadas en anticuerpos que implican administrar los anticuerpos de la divulgación a un paciente tal como un animal, un mamífero y un ser humano para tratar uno o más de los trastornos o afecciones descritos en el presente documento. Los compuestos terapéuticos de la divulgación incluyen, pero no de manera limitada, anticuerpos de la divulgación (incluyendo variantes y derivados de la misma como se describe en el presente documento) y ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican anticuerpos de la divulgación (incluyendo variantes y derivados de la misma como se describe en el presente documento).

[0129] Los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación, en algunas realizaciones, pueden usarse para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno inflamatorio o autoinmune, o cáncer. También se cree que los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación son útiles para tratar los mecanismos subyacentes del dolor o el dolor como tal.

[0130] El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) se conocía originalmente por su capacidad para generar colonias de granulocitos y macrófagos a partir de precursores de la médula ósea. También se ha demostrado que actúa sobre las células mieloides maduras como factores a favor de la supervivencia, activación y diferenciación. Estudios recientes sugieren que el GM-CSF también tiene muchas funciones proinflamatorias y desempeña funciones críticas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

[0131] El GM-CSF promueve la supervivencia y activación de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, así como la maduración de células dendríticas (DC). GM-CSF puede polarizar macrófagos en macrófagos inflamatorios tipo M1, que producen una variedad de citoquinas inflamatorias como TNF, IL-6, IL-12p70, IL-23 o IL-1 β , y por lo tanto

promueven respuestas Th1-Th17. Por otro lado, también se ha informado de la asociación de inmunidad GM-CSF y Th2 en la inflamación de las vías respiratorias alérgicas.

[0132] El receptor de GM-CSF consiste en una subunidad α que se une a GM-CSF con baja afinidad (GMR α) y una subunidad βc de transducción de señales que se comparte con los receptores IL-3 e IL-5. El complejo binario de GM-CSF y GMR α interactúa con una subunidad βc libre y forma el complejo hexamérico de alta afinidad. Los complejos de dodecámero formados por la agregación lateral de dos complejos de hexámero le permiten a Jak2 asociado con una subunidad βc dimerizar y transfosforilar, pero los complejos de hexámero no lo hacen. Esta estructura conduce a respuestas dependientes de la dosis de la activación del receptor de GM-CSF. La baja concentración de GM-CSF, como en condiciones normales, causa la fosforilación de βc Ser585 y activa la ruta de la quinasa 14-3-3/PI-3 que solo conduce a la supervivencia celular. Una mayor concentración de GM-CSF, como en el estado inflamatorio, desactiva la fosforilación de βc Ser585 y la fosforilación mediada de βc Tyr577 y la activación de la vía Jak2/STAT5, la vía de la proteína quinasa activada por Ras/mitógeno y la vía de la quinasa PI-3, lo que resulta en la promoción de supervivencia celular, proliferación y activación.

[0133] Una amplia variedad de células puede producir GM-CSF. Las principales fuentes de GM-CSF son las células T y B, las células endoteliales de monocitos/macrófagos y los fibroblastos. Los neutrófilos, eosinófilos, células epiteliales, células mesoteliales, células de Paneth, condrocitos y células tumorales también pueden producir GM-CSF. La producción de GM-CSF se ve estimulada por varios factores, entre ellos TNF, IL-1, agonistas de receptores tipo Toll y prostaglandina E2. Recientemente, se ha aclarado la patogenicidad de las células T CD4 productoras de GM-CSF en enfermedades autoinmunes e inflamatorias y gana cada vez más atención.

[0134] La evidencia reciente reveló que GM-CSF jugó un papel crítico en el desarrollo de muchas enfermedades autoinmunes. El agotamiento o neutralización de GM-CSF suprime muchos modelos de enfermedades autoinmunes, incluyendo la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la artritis, la enfermedad pulmonar intersticial relacionada con la artritis, la nefritis o la psoriasis. También se sugiere que la inhibición de GM-CSF puede ser útil para tratar el cáncer.

[0135] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inflamatoria a ser tratada por los anticuerpos, fragmentos y composiciones descritos incluye una o más de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Addison, aterosclerosis, espondilitis anquilosante, artritis, osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica (AP), espondilitis anquilosante, asma, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de Crohn, colitis, dermatitis, diverticulitis, fibromialgia, hepatitis, síndrome del intestino irritable (SII), lupus sistémico eritematoso (LES), nefritis, enfermedad de Parkinson (EP), vasculitis y colitis ulcerosa.

[0136] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección autoinmune a tratar por los anticuerpos, fragmentos y composiciones de la divulgación incluyen una o más de alopecia areata, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, dermatomiositis, diabetes (tipo 1), enfermedad celíaca, artritis idiopática juvenil autoinmune, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia gravis, miocarditis autoinmune, esclerosis múltiple, pénfigo/pénfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide (AE), esclerodermia/esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune, tiroiditis de Hashimoto, uveítis autoinmune, vitiligo y granulomatosis con poliangitis (Wegener's).

[0137] La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmune a largo plazo que afecta principalmente a las articulaciones. Por lo general, resulta en articulaciones calientes, hinchadas y dolorosas. El dolor y la rigidez suelen empeorar después del reposo. Más comúnmente, la muñeca y las manos están involucradas, con las mismas articulaciones típicamente involucradas en ambos lados del cuerpo. La enfermedad también puede afectar otras partes del cuerpo. Si bien la causa de la artritis reumatoide no es clara, se cree que implica una combinación de factores genéticos y ambientales. El mecanismo subyacente involucra al sistema inmunológico del cuerpo atacando las articulaciones. Esto da lugar a la inflamación y engrosamiento de la cápsula articular. Los objetivos del tratamiento son reducir el dolor, disminuir la inflamación y mejorar el funcionamiento general de una persona. Los medicamentos para el dolor, los esteroides y los AINEs se usan con frecuencia para ayudar con los síntomas. Se puede usar un grupo de fármacos llamados medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs, por las siglas en inglés de disease-modifying antirheumatic drugs), como la hidroxicloroquina y el metotrexato, para tratar de retardar la progresión de la enfermedad.

[0138] La osteoartritis (OA) es un tipo de enfermedad de las articulaciones que resulta de la degradación del cartílago articular y el hueso subyacente. Los síntomas más comunes son dolor en las articulaciones y rigidez. Inicialmente, los síntomas pueden aparecer solo después del ejercicio, pero con el tiempo pueden volverse constantes. Otros síntomas pueden incluir hinchazón de las articulaciones, disminución del rango de movimiento y, cuando la espalda se ve afectada, debilidad o entumecimiento de los brazos y las piernas. Las causas incluyen lesiones articulares previas, desarrollo anormal de articulaciones o extremidades, y factores hereditarios. El riesgo es mayor en quienes tienen sobrepeso, tienen una pierna de diferente longitud y tienen trabajos que resultan en altos niveles de estrés en las articulaciones. Se cree que la osteoartritis es causada por estrés mecánico en la articulación y procesos inflamatorios de bajo grado. El tratamiento incluye ejercicio, esfuerzos para disminuir el estrés en las articulaciones, grupos de apoyo y medicamentos para el dolor.

[0139] La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante en la que se dañan las cubiertas aislantes de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. Este daño interrumpe la capacidad de las partes del sistema nervioso para comunicarse, dando como resultado una variedad de signos y síntomas, que incluyen problemas físicos, mentales y, a veces, psiquiátricos. Los síntomas específicos pueden incluir visión doble, ceguera en un ojo, debilidad muscular, problemas con la sensación o problemas con la coordinación. Si bien la causa no está clara, se cree que el mecanismo subyacente es la destrucción del sistema inmunológico o el fracaso de las células productoras de mielina. No se conoce cura para la esclerosis múltiple. Los tratamientos intentan mejorar la función después de un ataque y prevenir nuevos ataques.

[0140] El asma es una enfermedad inflamatoria común a largo plazo de las vías respiratorias de los pulmones. Se caracteriza por síntomas variables y recurrentes, obstrucción reversible del flujo de aire y broncoespasmo. Los síntomas incluyen episodios de sibilancias, tos, opresión en el pecho y dificultad para respirar. Se cree que el asma es causada por una combinación de factores genéticos y ambientales. Los factores ambientales incluyen la exposición a la contaminación del aire y los alérgenos. El asma se clasifica según la frecuencia de los síntomas, el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) y la tasa de flujo espiratorio máximo. También puede clasificarse como atópica o no atópica, donde la atopia se refiere a una predisposición a desarrollar una reacción de hipersensibilidad tipo 1. No hay cura para el asma. Los síntomas se pueden prevenir

evitando los factores desencadenantes, como los alérgenos e irritantes, y mediante el uso de corticosteroides inhalados. Los agonistas beta de acción prolongada (LABA) o los agentes antileucotrienos se pueden usar además de los corticosteroides inhalados si los síntomas del asma no se controlan. El tratamiento de los síntomas que empeoran rápidamente se da generalmente con un agonista beta-2 de acción corta inhalado, tal como el salbutamol y los corticosteroides que se toman por vía oral. En casos muy graves, pueden requerirse corticosteroides intravenosos, sulfato de magnesio y hospitalización.

[0141] La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un tipo de enfermedad pulmonar obstructiva caracterizada por un flujo de aire deficiente a largo plazo. La EPOC puede incluir dos afecciones principales, enfisema y bronquitis crónica. En el enfisema, las paredes entre muchos de los sacos de aire están dañadas. Como resultado, los sacos de aire pierden su forma y se vuelven flojos. Este daño también puede destruir las paredes de los sacos de aire, lo que lleva a menos y más grandes sacos de aire en lugar de muchos pequeños. Si esto sucede, se reduce la cantidad de intercambio de gases en los pulmones. En la bronquitis crónica, el revestimiento de las vías respiratorias permanece irritado e inflamado constantemente, y esto hace que el revestimiento se inflame. Se forma mucho moco espeso en las vías respiratorias, lo que dificulta la respiración. No se conoce una cura para la EPOC, pero los síntomas son tratables y su progresión puede retrasarse.

[0142] El dolor es una sensación de angustia a menudo causada por estímulos intensos o perjudiciales, como golpearse un dedo del pie, quemarse un dedo, poner alcohol en una cortada o golpearse el "hueso gracioso". El dolor es un fenómeno subjetivo complejo, definir dolor ha sido un desafío. El dolor también se conoce como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial. El dolor a veces se considera como un síntoma de una afección subyacente, como la inflamación.

[0143] En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita. El método, en una realización, implica administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación.

[0144] Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

[0145] Otras enfermedades o afecciones asociadas con el aumento de la supervivencia celular, que pueden tratarse, prevenirse, diagnosticarse y/o pronosticarse con los anticuerpos o variantes, o derivados de los mismos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, la progresión y/o metástasis de neoplasias malignas y trastornos relacionados, como leucemia (incluidas las leucemias agudas (por ejemplo leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo a su vez mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (por ejemplo enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada, y tumores sólidos que incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, sarcoma de endotelio, linfangiosarcoma, sarcoma linfangioendotelio, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de seno, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cérvix, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, tumor epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

[0146] Una dosis específica y un régimen de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo los anticuerpos particulares, las variantes o derivados de los mismos utilizados, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta del paciente, el momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se está tratando. El juicio de tales factores por parte de los cuidadores médicos está dentro de la habilidad ordinaria de las personas normalmente versadas en la materia. La cantidad también dependerá del paciente individual a tratar, la vía de administración, el tipo de formulación, las características del compuesto utilizado, la gravedad de la enfermedad y el

efecto deseado. La cantidad utilizada se puede determinar por principios farmacológicos y farmacocinéticos bien conocidos en la técnica.

[0147] Los métodos de administración de los anticuerpos, variantes incluyen, pero no se limitan a, rutas intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, subcutáneas, intranasales, epidurales y orales. Los polipéptidos o composiciones de unión a antígeno pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección de bolus, por absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos de unión a antígeno de la divulgación se pueden administrar por vía oral, rectal, parenteral, intracistemalmente, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como por polvos, ungüentos, gotas o parches transdérmicos), bucalmente, o como un spray oral o nasal.

[0148] El término “parenteral” como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

[0149] La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos de la divulgación en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio, como un reservorio de Ommaya. También puede emplearse la administración pulmonar por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización.

[0150] Puede ser deseable administrar los polipéptidos de unión a antígeno o composiciones de la divulgación localmente al área que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, en combinación con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante. Dicho implante es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Preferiblemente,

cuando se administra una proteína, incluido un anticuerpo, de la divulgación, se debe tener cuidado de usar materiales que no absorba la proteína.

[0151] En otra realización, el polipéptido o composición de unión a antígeno puede ser administrado en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533; Treat *et al.*, *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase generalmente *ibid.*)

[0152] En otra realización más, el polipéptido o composición de unión a antígeno se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véase también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en la proximidad del objetivo terapéutico, es decir, el cerebro, por lo que solo se requiere una fracción de la dosis sistémica (véase por ejemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

[0153] En una realización específica en la que la composición de la divulgación comprende un ácido nucleico o polinucleótido que codifica una proteína, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, al construirlo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrarlo de modo que se convierta en intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente de Estados Unidos 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de micropartículas de bombardeo (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolos en un enlace a un péptido similar a la homeobox que se sabe que ingresa al núcleo (véase por ejemplo, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, mediante recombinación homóloga.

[0154] La cantidad de los anticuerpos de la divulgación que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria, inmune o maligna puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o sistemas de prueba de modelos de animales.

[0155] Como propuesta general, la dosis de los polipéptidos de unión a antígeno de la presente divulgación administrada a un paciente es típicamente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente, entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, o 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga en el cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, a menudo es posible una menor dosis de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosis y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la divulgación pueden reducirse aumentando la captación y la penetración en el tejido (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, la lipidación.

[0156] Los métodos para tratar una enfermedad infecciosa o maligna, afección o trastorno que comprende la administración de un anticuerpo, variante o derivado del mismo, de la divulgación son típicamente probados *in vitro*, y luego *in vivo* en un modelo animal aceptable para el tratamiento terapéutico o actividad profiláctica deseados, antes de su uso en humanos. Los modelos animales adecuados, que incluyen animales transgénicos, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* para demostrar la utilidad terapéutica del polipéptido de unión a antígeno descrito aquí incluyen el efecto de un polipéptido de unión a antígeno en una línea celular o una muestra de tejido del paciente. El efecto del polipéptido de unión a antígeno en la línea celular y/o muestra de tejido puede determinarse utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica,

tales como los ensayos descritos en otra parte en el presente documento. De acuerdo con la divulgación, los ensayos *in vitro* que se pueden usar para determinar si la administración de un polipéptido de unión a antígeno específico es la indicada, incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra de tejido del paciente crece en cultivo y se expone o se administra de otra manera un compuesto, y se observa el efecto de dicho compuesto sobre la muestra de tejido.

[0157] Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar un anticuerpo de la divulgación o un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la divulgación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc.

[0158] En una realización adicional, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con un agente antineoplásico, un agente antiviral, un agente antibacteriano o antibiótico o agentes antifúngicos. Cualquiera de estos agentes conocidos en la técnica puede ser administrado en las composiciones de la presente divulgación.

[0159] En otra realización, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que pueden administrarse con las composiciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, derivados de antibióticos (por ejemplo doxorrubicina, bleomicina, daunorubicina y dactinomicina); antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno); antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo, 5-FU, metotrexato, floxuridina, interferón alfa-2b, ácido glutámico, plicamicina, mercaptopurina y 6-tioguanina); agentes citotóxicos (por ejemplo carmustina, BCNU, lomustina, CCNU, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiurea, procarbazona, mitomicina, busulfán, cisplatino y sulfato de vincristina); hormonas (por ejemplo medroxiprogesterona, estramustina fosfato sódico, etinilestradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, difosfato de dietilestilbestrol, clorotrianiseno y testolactona); derivados de la mostaza nitrogenada (por ejemplo melfalán, clorambucil, mecloretamina (mostaza nitrogenada) y tiotepa); esteroides y combinaciones (por ejemplo, betametasona fosfato sódico); y otros (por ejemplo dicarbazina, asparaginasa, mitotano, sulfato de vincristina, sulfato de vinblastina y etopósido).

Combinaciones de Composiciones y Terapias

[0160] Los anticuerpos anti-GM-CSF de la presente divulgación se pueden usar, en algunas realizaciones, junto con otro agente terapéutico.

[0161] En alguna realización, el segundo agente terapéutico es un agente antiinflamatorio. Los ejemplos no limitantes incluyen aspirina, ibuprofeno, naproxeno, celecoxib (Celebrex), piroxicam (Feldene), indometacina (Indocin), meloxicam (Mobic Vivlodex), ketoprofeno (Orudis, Ketoprofen ER, Oruvail, Actron), sulindac (Clinor), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), oxaprozin (Daypro), tolmetin (Tolmetin Sodium, Tolectin), salsalato (Disalcid), etodolac (Lodine), fenoprofeno (Nalfon), flurbiprofeno (Ansaid), ketorolac (Toradol), meclofenamato y ácido mefenámico (Ponstel).

[0162] En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es adecuado para tratar una enfermedad autoinmune. Los ejemplos no limitantes incluyen glucocorticoides, un anticuerpo anti-CD3 como Muromonab-CD3, inhibidores de IL-2a como basiliximab (Simulect) y daclizumab (Zenapax), inhibidores de la calcineurina como tacrolimus y ciclosporin, sirolimus, everolimus, interferones, opioides, proteínas o anticuerpos de unión a TNF, y micofenolato.

[0163] En alguna realización, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer. Los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar por su mecanismo de acción en, por ejemplo, los siguientes grupos:

- agentes antimetabolitos/anticancerígenos, tales como los análogos de la pirimidina floxuridina, capecitabina y citarabina;
- análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados;
- Agentes antiproliferativos/antimitóticos, que incluyen productos naturales como el alcaloide de la vinca (vinblastina, vincristina) y microtúbulos, como el taxano (paclitaxel, docetaxel), vinblastina, nocodazol, epotilones, vinorelbina (NAVELBINE®) y epipodofilotoxinas (etopósido, teniposido).
- Agentes que dañan el ADN tales como actinomicina, amsacrina, busulfán, carboplatino, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida (CYTOXAN®), dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, ifosfamida, melfalán,

mercloreteamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, procarbazona, taxol, taxotero, tenipos, etopósido y trietilentofofosforamida;

- antibióticos como dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina;
- enzimas como la L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente la L-asparagina y priva a las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina;
- agentes antiplaquetarios;
- agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos, como la ciclofosfamida de mostazas nitrogenadas, y análogos (melfalán, clorambucil, hexametilmelamina y tiotepa), alquil nitrosoureas (carmustina) y análogos, estreptoquinasa y triazenos (dacarbazina);
- antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos, tales como análogos del ácido fólico (metotrexato);
- complejos de coordinación de platino (cisplatino, oxiloplatino y carboplatino), procarbazona, hidroxiaurea, mitotano y aminoglutetimida;
- hormonas, análogos de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida y nilutamida) e inhibidores de la aromatasa (letrozol y anastrozol);
- anticoagulantes tales como heparina, sales de heparina sintéticas y otros inhibidores de la trombina;
- agentes fibrinolíticos tales como activador del plasminógeno tisular, estreptoquinasa, uroquinasa, aspirina, dipiridamol, ticlopidina y clopidogrel;
- agentes antimigratorios;
- agentes antiseoretos (breveldin);
- inmunosupresores tacrolimus, sirolimus, azatioprina y micofenolato;

- compuestos (TNP-470, genisteína) e inhibidores del factor de crecimiento (inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular e inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos);
- bloqueadores del receptor de angiotensina, donantes de óxido nítrico;
- oligonucleótidos antisentido;
- anticuerpos como trastuzumab y rituximab;
- inhibidores del ciclo celular e inductores de diferenciación, como la tretinoína;
- inhibidores de la topoisomerasa (doxorubicina, daunorubicina, dactinomicina, enipósido, epirubicina, etopósido, idarubicina, irinotecan, mitoxantrona, topotecán, e irinotecán) y corticosteroides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona y prednisolona)
- inhibidores de la quinasa de la señal de traducción del factor de crecimiento;
- inductores de disfunción;
- toxinas como la toxina del cólera, la ricina, la exotoxina de *Pseudomonas*, la toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, la toxina diftérica y activadores de caspasa;
- y cromatina.

Composiciones

[0164] La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo y un portador aceptable. En algunas realizaciones, la composición incluye además un segundo agente terapéutico.

[0165] En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa que ha sido aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. Además, un “portador farmacéuticamente

aceptable” generalmente será una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo.

[0166] El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los provenientes de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas en dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y excipientes similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH tales como acetatos, citratos o fosfatos. Agentes antibacteriales tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; y se consideran agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin, incorporado en este documento por referencia. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido de unión a antígeno, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración. La preparación parental puede ser en ampollas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiples de vidrio o plástico.

[0167] En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa en seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local como la lidocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado, como una ampolla o sachet que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

[0168] Los compuestos de la divulgación pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como las derivadas del sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación De Anticuerpos Murinos

[0169] Este ejemplo describe el proceso de preparación de anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano-GM-CSF usando la tecnología de hibridoma. La proteína GM-CSF humana recombinante se usó como antígeno. Para generar anticuerpos monoclonales de ratón contra GM-CSF humano, se inmunizaron primero diferentes cepas de ratones de 6-8 semanas, incluyendo los ratones BALB/c, C57/BL6 o SJL con 20 µg de GM-CSF humano recombinante. En los días 14, 28 y 42 después de la primera inmunización, los ratones inmunizados se volvieron a inmunizar con 5 µg de proteína recombinante. Para seleccionar ratones que producen anticuerpos que se unen a la proteína GM-CSF, los sueros de ratones inmunizados fueron analizados mediante ELISA. Brevemente, las placas de microtitulación se recubrieron con proteína GM-CSF humana a 1 µg/ml en PBS, 100

μl/pozo a temperatura ambiente (TA) durante toda la noche, luego se bloquearon con 100 μl/pozo de BSA al 5%. Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados a cada pozo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con Peroxidasa de Rábano Picante (HRP por las siglas en inglés de Horse Radish Peroxidase) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS y se analizaron con un espectrofotómetro a OD 405 nm. Los ratones con suficientes títulos de IgG anti-GM-CSF se reforzaron con 25 μg de proteína GM-CSF humana recombinante en el día 60 posterior a la inmunización. Los ratones resultantes se usaron para las fusiones.

[0170] Los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para determinar las IgGs anti-GM-CSF mediante evaluación por ELISA. Los clones primarios de hibridoma positivos de ELISA fueron seleccionados para la subclonación utilizando un método de dilución limitada y se analizaron adicionalmente mediante un ensayo de unión de ELISA confirmatorio (**Figura 1**) y un ensayo de proliferación de TF-1 (**Figura 2**). Antes de la estimulación con GM-CSF, las células TF-1 se lavaron con medio basal RPMI1640 y se dejaron sin alimento durante toda la noche. En el día 2, se recogieron estas células y luego se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/ml en 50 μl por pozo de una placa de cultivo celular de 96 pozos de fondo plano.

[0171] El GM-CSF (Genscript) recombinante humano a una concentración de 0,2 ng/ml (4X) se combinó 1:1 con el sobrenadante de cultivo de hibridoma al 20% (4X) y se añadieron 50 μl de la mezcla a las células TF-1, de tal manera que la concentración final para GM-CSF fue de 0.05 ng/ml y para el sobrenadante de hibridoma fue de 5%. La proliferación celular máxima (0% de inhibición) se midió incubando células TF-1 a una concentración final de GM-CSF de 0.05 ng/ml, sin la adición de sobrenadante de hibridoma. El 100% de inhibición de la proliferación de TF-1 se midió omitiendo GM-CSF del ensayo y manteniendo las células en medio completo RPMI1640 solamente. Las células TF-1 se incubaron luego durante 72 horas a 37 ° C. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® de acuerdo con el protocolo del fabricante.

[0172] En general, hubo tres monoclonos de hibridoma 23F4, 32C4 y 50C5 que mostraron una inhibición significativa de la proliferación de TF-1, mientras que 23F4 y 50C5 se seleccionaron para una caracterización adicional.

Ejemplo 2. Unión De Los Anticuerpos Murinos A GM-CSF Humanos o Rhesus

[0173] Este ejemplo prueba la respuesta de la dosis de la unión de ELISA de mAb anti-GM-CSF de ratón a la proteína recombinante GM-CSF humana o rhesus (1 µg/ml a 100 µl).

[0174] La proteína GM-CSF humana recombinante o rhesus (Genscript) se recubrió a 1 µg/ml en PBS sobre placas de microtitulación durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Después del recubrimiento del antígeno, los pozos se bloquearon con PBS/Tween al 0,05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado de los pozos con PBST, se agregaron diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GM-CSF al pozo y se incubaron durante 1 a temperatura ambiente. Para la detección de los anticuerpos de unión, se agregaron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc de ratón (Jackson Immuno Research), seguido de la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pozos de la placa se lavaron con PBST tres veces. La fluorescencia se midió en un lector de placas TECAN Spectrafluor.

[0175] Como se muestra en la **Figura 3**, ambos anticuerpos 23F4 y 50C5 mostraron una unión dependiente de la dosis al GM-CSF humano con EC50 de 11.8 ng/ml y 14.6 ng/ml respectivamente, y rhesus GM-CSF con EC50 de 10.2 ng/ml y 21.7 ng/ml respectivamente.

Ejemplo 3. Cinética De Unión De Los Anticuerpos Murinos Al GM-CSF Humano

[0176] La **Figura 4** traza la cinética de unión de 23F4 y 50C5 con GM-CSF humano recombinante. El GM-CSF humano recombinante se estableció como un analito con concentraciones en serie (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 nM). El ensayo de cinética de unión del anticuerpo al antígeno se realizó utilizando el sistema Biacore T200 a través de un método de captura de anticuerpos de ratón. La IgG anti- Fc de ratón fue inmovilizada en el chip del sensor CM5 según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de prueba fue inyectado y capturado por la IgG anti-Fc de ratón inmovilizada. Y luego se inyectaron individualmente las concentraciones en serie del antígeno, y se registró el perfil de unión para cada concentración de analito de antígeno, respectivamente. El sistema de ensayo se

regeneró por inyección de 10 mM de glicina-HCL con pH 1,5 durante 30 segundos. El tampón de funcionamiento era HBS-EP + (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM de NaCl, EDTA 3 mM y P20 al 0,05%). La temperatura del ensayo fue de 25°C, y el tiempo de asociación y disociación fue de 180 y 600 segundos, respectivamente.

[0177] Los datos de Biacore se ajustaron usando el software de evaluación Biacore T200 1.0 según el modelo de unión 1: 1 para calcular las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d), así como la constante de equilibrio (K_D). Además de la **Figura 4**, algunos datos resumidos son presentados en la siguiente tabla.

Muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
23F4	8,723E+05	3,635E-05	4,168E-11
50C5	2,718E+06	1,204E-04	4,431E-11

Ejemplo 4. Bloqueo de La Unión De GM-CSF Al Receptor Alfa De GM-CSF por Los Anticuerpos Murinos

[0178] Para probar la potencia de los anticuerpos en el bloqueo de la unión de GM-CSF a la cadena alfa del receptor GM-CSF, la proteína alfa del receptor GM-CSF humano recombinante (CD116) se recubrió a 2 µg/ml en PBS en placas de microtitulación para pasar la noche a 4°C. Después del recubrimiento del antígeno, los pozos se bloquearon con PBS/Tween al 0,05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado de los pozos con PBST, se agregaron diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GM-CSF al pozo en presencia de proteína biotinilada de GM-CSF humano (0,05 µg/ml) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

[0179] Para la detección de la unión de GM-CSF biotinilado al receptor revestido, se adicionó la estreptavidina conjugada con HRP, seguida de la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pozos de la placa se lavaron con PBST tres veces. La fluorescencia se midió en un lector de placas TECAN Spectrafluor. Como se muestra en la **Figura 5**, ambos anticuerpos mostraron una inhibición dependiente de la dosis de la unión de GM-CSF al receptor alfa de GM-CSF.

Ejemplo 5. Bloqueo de GM-CSF por la Señalización pSTAT5 Inducida por Anticuerpos Murinos

[0180] Los monocitos CD14 + se purificaron a partir de sangre humana periférica utilizando microperlas positivas para CD14 (Miltenyi Biotec). Los monocitos purificados fueron estimulados con GM-CSF humano (0,2 ng/ml) durante 30 minutos a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo 23F4. Después de la incubación, las células se recogieron y se lavaron con tampón FACS (1x PBS + 2% FBS) y se permeabilizaron con PFA al 2%, seguido de una fijación celular utilizando metanol enfriado con hielo. Luego, el anticuerpo anti-pSTAT5 conjugado con PE se añadió a las células para otra incubación de 30 minutos a 4°C y se analizó mediante citometría de flujo. El % de inhibición se calculó mediante $[1 - (\text{muestra de prueba MFI} / \text{control MFI})] \times 100\%$. La adición de los anticuerpos podría disminuir significativamente el nivel de activación de pSTAT5 inducida por GM-CSF en una dosis de 0,1 o 1 µg/ml (**Figura 6**).

Ejemplo 6. Inhibición de la Proliferación De TF-1 Dependiente de GM-CSF por los Anticuerpos Murinos

[0181] Antes de la estimulación con GM-CSF, las células TF-1 se lavaron con medio basal RPMI1640 y se dejaron sin alimento durante toda la noche. En el día 2, estas células se recogieron y luego se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/ml en 50 µl por pozo de una placa de cultivo celular de 96 pozos de fondo plano. El GM-CSF (Genscript) humano recombinante a una concentración de 0,2 ng/ml (4X) se mezcló 1:1 con anticuerpos murinos anti-GM-CSF (0,01 ng/ml - 1000 ng/ml diluidos en medio completo) y 50 µl de la mezcla se añadió a las células TF-1. La proliferación celular máxima (0% de inhibición) se midió incubando células TF-1 a una concentración final de GM-CSF de 0,05 ng/ml, sin la adición de anticuerpo. El 100% de inhibición de la proliferación de TF-1 se midió omitiendo GM-CSF del ensayo y manteniendo las células únicamente en medio RPMI1640 completo. Las células TF-1 se incubaron luego durante 72 horas a 37°C. La viabilidad celular se midió mediante el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo® según el protocolo del fabricante. El valor de CI50 para 23F4 y 50C5 en la inhibición de la proliferación de TF-1 fue de aproximadamente 10,9 ng/ml (**Figura 7**).

Ejemplo 7. Humanización de los Anticuerpos Murinos

[0182] Los genes de la región variable de los anticuerpos murinos se emplearon para crear MAb humanizados. En el primer paso de este proceso, se compararon las secuencias de aminoácidos de VH y VK de los anticuerpos con la base de datos disponible de secuencias del gen Ig humano para encontrar las secuencias genéticas de Ig de la línea germinal humana más adecuadas.

[0183] Se diseñaron las secuencias de dominio variable humanizadas, donde la CDR1, 2 y 3 de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo se injertaron en secuencias marco de los genes de Ig humanos. Luego se generó un modelo 3D para determinar si había alguna posición de marco donde al reemplazar el aminoácido del ratón por el aminoácido humano (mutaciones secundarias) podría afectar la unión y/o la conformación de CDR. Las secuencias relevantes y las mutaciones anteriores se muestran en las tablas presentadas a continuación.

Secuencias CDR de 23F4 VH

CDR1	SHYLH (ID de SEC.1)
CDR2	WIFPGDDKTKYNEKFKG (ID de SEC.2)
CDR3	GTKYLNWNFDV (ID de SEC.3)

Secuencias CDR de 23F4 VL

CDR1	KANQNVGTTLA (ID de SEC.4)
CDR2	SASYRYS (ID de SEC.5)
CDR3	HQYTTYPLT (ID de SEC.6)

Diseño de humanización para 23F4

Diseño VH I: VH1-f/JH6	
Modelo	Mutación
23F4 VH	Quimera
23F4 VH.1	CDR-injertado, Q1E, T98R
23F4 VH.1a	Basada en 23F4 VH.1, A72S
23F4 VH.1b	Basada en 23F4VH.1, A72S, V68A
23F4 VH.1c	Basada en 23F4VH.1, A72S, V68A, I70L, M48I

23F4 VH.1d	Basada en 23F4VH.1, A72S, V68A, I70L, M48I, G26D, F29L
Diseño VH II: VH1-f/JH6	
23F4 VH.2	CDR-injertado, Q1E
23F4 VH.2a	Basada en 23F4 VH.2, R72S
23F4 VH.2b	Basada en 23F4 VH.2, R72S, M70L
23F4 VH.2c	Basada en 23F4 VH.2, R72S, M70L, M48I, V68A
23F4 VH.2d	Basada en 23F4 VH.2, R72S, M70L, M48I, V68A, G26D, F29L
Diseño VK: L8/Jk4	
Modelo	Mutación
23F4Vk	Quimera
23F4 Vk.1	CDR-injertado
23F4 Vk.1a	Basada en 23F4 Vk.1, L46A
23F4 Vk.1b	Basada en 23F4 Vk.1, L46A, S60D, E70D
23F4 Vk.1c	Basada en 23F4 Vk.1, L46A, S60D, E70D, A43S, Y87F

[0184] Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de algunos de los anticuerpos humanizados 23F4 se enumeran en la tabla presentada a continuación.

Secuencias de anticuerpos humanizados (los residuos de CDR están subrayados y las mutaciones secundarias están indicadas dentro de las casillas)

23F4 VH	QVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKTSDYTLT <u>SHY</u> LHWVKRPGQGLEWIGW IFPGDDKTKYNEKFGRATLTSDTSDTAYMELSSLRSEDVAVYYCARTG KYLWNFDVWGQGTTVTVSS	ID de SEC.7
23F4 VH.1	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT <u>SHY</u> LHWVQAPGKGLEWMGW IFPGDDKTKYNEKFGRVTITADTSTDYMESSLRSEDVAVYYCARTG KYLWNFDVWGQGTTVTVSS	ID de SEC.8
23F4 VH.1a	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT <u>SHY</u> LHWVQAPGKGLEWMGW IFPGDDKTKYNEKFGRVTITSDTSTDYMESSLRSEDVAVYYCARTG KYLWNFDVWGQGTTVTVSS	ID de SEC.9
23F4 VH.1b	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT <u>SHY</u> LHWVQAPGKGLEWMGW IFPGDDKTKYNEKFGRATLTSDTSTDYMESSLRSEDVAVYYCARTG KYLWNFDVWGQGTTVTVSS	ID de SEC.10
23F4 VH.1c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT <u>SHY</u> LHWVQAPGKGLEWIGW IFPGDDKTKYNEKFGRATLTSDTSTDYMESSLRSEDVAVYYCARTG KYLWNFDVWGQGTTVTVSS	ID de SEC.11
23F4 VH.1d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT <u>SHY</u> LHWVQAPGKGLEWIGW IFPGDDKTKYNEKFGRATLTSDTSTDYMESSLRSEDVAVYYCARTG KYLWNFDVWGQGTTVTVSS	ID de SEC.12

23F4 VH.2	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>SHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> VTMT <u>RT</u> SDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA <u>RGT</u> <u>KYLNWNFDV</u> WGQTTTVSS	ID de SEC.13
23F4 VH.2a	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>SHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> VTMT <u>S</u> DTTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA <u>RGT</u> <u>KYLNWNFDV</u> WGQTTTVSS	ID de SEC.14
23F4 VH.2b	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>SHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> VTMT <u>TS</u> DTTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA <u>RGT</u> <u>KYLNWNFDV</u> WGQTTTVSS	ID de SEC.15
23F4 VH.2c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>SHY</u> LHWVRQAPGQGLEW <u>T</u> GW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLT <u>S</u> DTTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA <u>RGT</u> <u>KYLNWNFDV</u> WGQTTTVSS	ID de SEC.16
23F4 VH.2d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>DY</u> LT <u>SHY</u> LHWVRQAPGQGLEW <u>T</u> GW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLT <u>S</u> DTTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA <u>RGT</u> <u>KYLNWNFDV</u> WGQTTTVSS	ID de SEC.17
23F4Vk	DIVLTQPPKFLSTSVGDRVSVTCKANQNVGTTLAWYQQKPGQSPKALIYS ASYRYSGVPRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAIEYFCHQYTTYPLTFGG GTKLEIK	ID de SEC.18
23F4 Vk.1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKLLIYS ASYRYSGVPSRFSGSGSTEFTLTISLQPEDFATYYCHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	ID de SEC.19
23F4 Vk.1a	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKA <u>LI</u> YS ASYRYSGVPSRFSGSGSTEFTLTISLQPEDFATYYCHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	ID de SEC.20
23F4 Vk.1b	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKA <u>LI</u> YS ASYRYSGVPR <u>DR</u> FSGSGSGT <u>DF</u> LTISLQPEDFATYYCHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	ID de SEC.21
23F4 Vk.1c	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCKANQNVGTTLAWYQQKPGK <u>SP</u> K <u>LI</u> YS ASYRYSGVPR <u>DR</u> FSGSGSGT <u>DF</u> LTISLQPEDFATY <u>F</u> CHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	ID de SEC.22

Combinación de VH/VK para el Anticuerpo de Humanización 23F4

Vk VH	23F4 Vk.1	23F4 Vk.1a	23F4 Vk.1b	23F4 Vk.1c	23F4 Vk
23F4 VH.1	Hu23F4-1	Hu23F4-2	Hu23F4-3	Hu23F4-4	
23F4 VH.1a	Hu23F4-5	Hu23F4-6	Hu23F4-7	Hu23F4-8	
23F4 VH.1b	Hu23F4-9	Hu23F4-10	Hu23F4-11	Hu23F4-12	
23F4 VH.1c	Hu23F4-13	Hu23F4-14	Hu23F4-15	Hu23F4-16	
23F4 VH.1d	Hu23F4-17	Hu23F4-18	Hu23F4-19		
23F4 VH.2	Hu23F4-20	Hu23F4-21	Hu23F4-22	Hu23F4-23	
23F4 VH.2a	Hu23F4-24	Hu23F4-25	Hu23F4-26	Hu23F4-27	
23F4 VH.2b	Hu23F4-28	Hu23F4-29	Hu23F4-30	Hu23F4-31	
23F4 VH.2c	Hu23F4-32	Hu23F4-33	Hu23F4-34	Hu23F4-35	
23F4 VH.2d	Hu23F4-36	Hu23F4-37	Hu23F4-38		
23F4 VH					23F4 quimera

Secuencias CDR de 50C5 VH

CDR1	PYSIH (ID de SEC.23)
CDR2	YINPSTGYIEYNQHFKD (ID de SEC.24)
CDR3	GGDYEGYFDY (ID de SEC.25)

Secuencias CDR de 50C5 VL

CDR1	RLNENIYSFLA (ID de SEC.26)
CDR2	NAETLAE (ID de SEC.27)
CDR3	QQHYGTPYT (ID de SEC.28)

Diseño de humanización para 50C5

Diseño VH I: VH1-69/JH6	
Modelo	Mutación
50C5 VH	Quimera
50C5 VH.1	CDR-injertado, Q1E
50C5 VH.1a	Basada en 50C5 VH.1, S84R
50C5 VH.1b	Basada en 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I
50C5 VH.1c	Basada en 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I
50C5 VH.1d	Basada en 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I, V68T, I70L
50C5 VH.1e	Basada en 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I, V68T, I70L, S30T
Diseño VK: O12/Jk4	
Modelo	Mutación
50C5Vk	Quimera
50C5 Vk.1	CDR-injertado
50C5 Vk.1a	Basada en 50C5 Vk.1, I48V
50C5 Vk.1b	Basada en 50C5 Vk.1, I48V, G57D
50C5 Vk.1c	Basada en 50C5 Vk.1, I48V, G57D, D70Q
50C5 Vk.1d	Basada en 50C5 Vk.1, I48V, G57D, D70Q, A43S

Secuencias de anticuerpos humanizados (los residuos de CDR están subrayados y las mutaciones secundarias están indicadas dentro de las casillas)

50C5 VH	QVQLQQSAAELVRPGASVKMSCKAS <u>GGYIFTPYSIH</u> HWIKRPGQGLEWIGY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RTTLTADKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGTTLVSS	ID de SEC.29
50C5 VH.1	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS <u>GGTFS</u> <u>PYSIH</u> WVRQAPGQGLEWMGY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RVTTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGTTVTVSS	ID de SEC.30

50C5 VH.1a	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u>	ID de SEC.31
50C5 VH.1b	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>M</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u>	ID de SEC.32
50C5 VH.1c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u>	ID de SEC.33
50C5 VH.1d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u>	ID de SEC.34
50C5 VH.1e	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u>	ID de SEC.35
50C5 Vk	DIQMTQSPDLSASVGETVTITCRLNENIYSFLAWYQQKQKSPQLLVYNA ETLAEDVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLTDDFGTYYCQQHYGTPYTFGGGT NLEIE	ID de SEC.36
50C5 Vk.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA ETLAEDVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYGTPYTFGGGT KVEIK	ID de SEC.37
50C5 Vk.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA ETLAEDVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYGTPYTFGGGT KVEIK	ID de SEC.38
50C5 Vk.1b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA ETLAEDVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYGTPYTFGGGT KVEIK	ID de SEC.39
50C5 Vk.1c	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA ETLAEDVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCQQHYGTPYTFGGGT KVEIK	ID de SEC.40
50C5 Vk.1d	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKSPKLLIYNA ETLAEDVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCQQHYGTPYTFGGGT KVEIK	ID de SEC.41

Combinación de VH/VK para el Anticuerpo de Humanización 50C5

VH \ VK	50C5 Vk.1	50C5 Vk.1a	50C5 Vk.1b	50C5 Vk.1c	50C5 Vk.1d	50C5 Vk
50C5 VH.1						
50C5 VH.1a	Hu50C5-1	Hu50C5-2	Hu50C5-3	Hu50C5-4	Hu50C5-5	
50C5 VH.1b	Hu50C5-6	Hu50C5-7	Hu50C5-8	Hu50C5-9	Hu50C5-10	
50C5 VH.1c	Hu50C5-11	Hu50C5-12	Hu50C5-13	Hu50C5-14	Hu50C5-15	
50C5 VH.1d	Hu50C5-16	Hu50C5-17	Hu50C5-18	Hu50C5-19	Hu50C5-20	
50C5 VH.1e	Hu50C5-21	Hu50C5-22	Hu50C5-23	Hu50C5-24		
50C5 VH						50C5 quimera

Ejemplo 8. Unión de Anticuerpos Humanizados a GM-CSF humano

[0185] Las variantes humanizadas se ensayaron para determinar la unión a GM-CSF humano recombinante como se describió previamente. La proteína GM-CSF humana recombinante (Genscript) se recubrió a 1 µg/ml en PBS en placas de microtitulación durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Después del recubrimiento del antígeno, los pozos se bloquearon con PBS/Tween al 0,05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado de los pozos con PBST, se agregaron diferentes concentraciones de anticuerpos humanizados anti-GM-CSF al pozo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

[0186] Para la detección de los anticuerpos de unión, se agregaron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc de ratón (Jackson Immuno Research), seguido de la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pozos de la placa se lavaron con PBST tres veces. La fluorescencia se midió en un lector de placas TECAN Spectrafluor. Como se muestra en la **Figura 8**, todas las variantes humanizadas demostraron una potencia de unión similar contra el GM-CSF humano en comparación con el anticuerpo quimérico.

Ejemplo 9. Cinética de Unión de Anticuerpos Humanizados

[0187] La cinética de unión de los anticuerpos humanizados fue medida por Biacore como se describió anteriormente. El GM-CSF humano recombinante se estableció como un analito con concentraciones en serie (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 nM). El ensayo de cinética de unión del anticuerpo al antígeno se realizó utilizando el sistema Biacore T200 a través de un enfoque de captura de anticuerpos humanos. La IgG Fc anti-humana se inmovilizó en un chip sensor CM5 según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de prueba fue inyectado y capturado por la IgG Fc anti-humana inmovilizada. Luego se inyectaron individualmente las concentraciones en serie del antígeno, y se registró el perfil de unión para cada concentración de analito de antígeno, respectivamente.

[0188] El sistema de ensayo se regeneró mediante inyección de Glicina-HCl 10 mM con un pH de 1,5 durante 30 segundos. El tampón de funcionamiento era HBS-EP + (HEPES 10 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl, EDTA 3 mM y P20 al 0,05%). La temperatura del ensayo fue de 25°C, y el tiempo de asociación y disociación fue de 180 y 600 segundos,

respectivamente. Los datos de Biacore se ajustaron utilizando el software de evaluación Biacore T200 1.0 de acuerdo con el modelo de unión 1:1 para calcular las constantes de velocidad de asociación (k_a) y disociación (k_d), así como la constante de equilibrio (K_D). Como se muestra en las tablas presentadas a continuación, de 23F4, Hu23F4-13, Hu23F4-27 y Hu23F4-36 demostraron la afinidad de unión más fuerte en comparación con el anticuerpo quimérico; de 50C5, Hu50C5-8, Hu50C5-17, Hu50C5-18, Hu50C5-19, Hu50C5-21 y Hu50C5-23 demostraron la afinidad de unión más fuerte en comparación con el anticuerpo quimérico.

Antígeno	Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
GM-CSF	3523-Hu23F4-5	1,188E+6	1,239E-4	1,043E-10
	3523-Hu23F4 -6	8,765E+5	1,353E-4	1,544E-10
	3523-Hu23F4-13	1,279E+6	1,195E-4	9,349E-11
	3523-Hu23F4-20	8,007E+5	1,137E-4	1,420E-10
	3523-Hu23 F4-23	8,994E+5	1,164E-4	1,295E-10
	3523-Hu23 F4-25	6,354E+5	1,091E-4	1,718E-10
	3523-Hu23F4-27	9,232E+5	9,461E-5	1,025E-10
	3523-Hu23F4-29	6,673E+5	1,013E-4	1,518E-10
	3523-Hu23F4-36	1,271E+6	1,026E-4	8,070E-11
	3523-Hu23F4-quimera	1,229E+6	3,873E-5	3,150E-11

Antígeno	Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
GM-CSF	35230Hu50C5-6	4,418E+6	1,375E-4	3,112E-11
	35230Hu50C5-8	4,911E+6	1,386E-4	2,822E-11
	35230Hu50C5-11	4,368E+6	1,363E-4	3,121E-11
	35230Hu50C5-17	4,466E+6	1,112E-4	2,491E-11
	35230Hu50C5-19	4,724E+6	1,089E-4	2,306E-11
	35230Hu50C5-19	4,622E+6	1,061E-4	2,295E-11
	35230Hu50C5-21	4,592E+6	1,082E-4	2,356E-11
	35230Hu50C5-23	4,535E+6	1,251E-4	2,760E-11
	35230Hu50C5-quimera	4,433E+6	1,419E-4	3,202E-11

Ejemplo 10. Inhibición de la Proliferación de TF-1 por Anticuerpos Humanizados

[0189] Antes de la estimulación con GM-CSF, las células TF-1 se lavaron con medio basal RPMI1640 y se dejaron sin alimento durante toda la noche. En el día 2, estas células se recogieron y luego se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/ml en 50 μ l por pozo de una placa de cultivo celular de 96 pozos de fondo plano. El GM-CSF (Genscript) humano recombinante a una concentración de 0,2 ng/ml (4X) se mezcló 1:1 con anticuerpos anti-GM-CSF humanizados (0,01 ng/ml - 1000 ng/ml diluidos en medio

completo) y 50 μ l de la mezcla se añadió a las células TF-1. La proliferación celular máxima (0% de inhibición) se midió incubando células TF-1 a una concentración final de GM-CSF de 0,05 ng/ml, sin la adición de anticuerpo. El 100% de inhibición de la proliferación de TF-1 se midió omitiendo GM-CSF del ensayo y manteniendo las células solo en medio completo RPMI1640. Las células TF-1 se incubaron luego durante 72 horas a 37°C. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® según con el protocolo del fabricante. Entre los anticuerpos humanizados de 23F4 probados, Hu23F4-13, Hu23F4-27 y Hu23F4-36 mostraron la inhibición más fuerte con una CI50 de 4,95 ng/ml, 3,95 ng/ml y 3,30 ng/ml, respectivamente (**Figura 9**). Entre los anticuerpos humanizados de 50C5 probados, Hu50C5-23 mostró la inhibición más fuerte con un CI50 de 14,31 ng/ml (**Figura 9**).

Nombre del Anticuerpo	CI50 para proliferación de TF-1
Hu23F4-quimera	8,55 ng/ml
Hu23F4-5	15,58 ng/ml
Hu23F4-6	7,87 ng/ml
Hu23F4-13	4,95 ng/ml
Hu23F4-20	8,77 ng/ml
Hu23F4-23	9,08 ng/ml
Hu23F4-25	12,22 ng/ml
Hu23F4-27	3,95 ng/ml
Hu23F4-29	27,44 ng/ml
Hu23F4-36	3,30 ng/ml

Nombre del Anticuerpo	CI50 para proliferación de TF-1
Hu50C5-quimera	86,47 ng/ml
Hu50C5-6	23,93 ng/ml
Hu50C5-8	45,90 ng/ml
Hu50C5-11	111,1 ng/ml
Hu50C5-17	22,06 ng/ml
Hu50C5-18	41,27 ng/ml
Hu50C5-19	16,99 ng/ml
Hu50C5-21	21,64 ng/ml
Hu50C5-23	14,31 ng/ml

Ejemplo 11. Bloqueo de la Señalización de pSTAT5 por Anticuerpos Humanizados

[0190] Los monocitos CD14⁺ se purificaron a partir de sangre humana periférica utilizando microperlas positivas CD14 (Miltenyi Biotec). Los monocitos purificados se

estimularon con GM-CSF humano (0,2 ng/ml) durante 30 minutos a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos humanizados. Después de la incubación, las células se recogieron y se lavaron con tampón FACS (1x PBS+ 2% FBS) y se permeabilizaron con PFA al 2%, seguido de fijación celular utilizando metanol enfriado con hielo. Luego, el anticuerpo anti-pSTAT5 conjugado con PE se añadió a las células para otra incubación de 30 minutos a 4°C y se analizó mediante citometría de flujo. El % de inhibición se calculó mediante $[1-(\text{muestra de prueba MFI/control MFI})] \times 100\%$. La adición de Hu23F4-13, Hu23F4-27, Hu23F4-36, Hu50C5-17 y Hu50C5-23 podría disminuir significativamente el nivel de activación de pSTAT5 inducida por GM-CSF en una dosis de 0,1 o 1 µg/ml (**Figura 10**).

Ejemplo 12. Unión de Anticuerpos Humanizados al GM-CSF Rhesus

[0191] La proteína GM-CSF rhesus recombinante (Genscript) se recubrió a 1 µg/ml en PBS sobre placas de microtitulación durante 2 horas a temperatura ambiente (TA). Después del recubrimiento del antígeno, los pozos se bloquearon con PBS/Tween al 0,05% (PBST) con BSA al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado de los pozos con PBST, se agregaron diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GM-CSF humanizados al pozo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de los anticuerpos de unión, se agregaron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc de ratón (Jackson Immuno Research), seguido de la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pozos de la placa se lavaron con PBST tres veces. La fluorescencia se midió en un lector de placas TECAN Spectrafluor. Como se muestra en la **Figura 11**, Hu23F4-13, Hu23F4-27 y Hu23F4-36 mostraron una unión dependiente de la dosis al rhesus GM-CSF con un EC50 de 7,44 ng/ml, 6,25 ng/ml y 7,75 ng/ml, respectivamente; Hu50C5-17 y Hu50C5-23 mostraron una unión dependiente de la dosis al rhesus GM-CSF con un EC50 de 18,86 ng/ml y 21,63 ng/ml, respectivamente.

Nombre del Anticuerpo	EC50 para la unión rhesus GM-CSF
Hu23F4-13	7,44 ng/ml
Hu23F4-27	6,25 ng/ml
Hu23F4-36	7,75 ng/ml
Hu50C5-17	18,86 ng/ml
Hu50C5-23	21,63 ng/ml

Ejemplo 13. Farmacocinética de Hu23F4-27 en Mono Cynomolgus

[0192] A partir de los resultados anteriores de los ensayos de bioactividad in vitro, se seleccionó Hu23F4-27 para determinar las propiedades farmacocinéticas en monos cynomolgus que no se habían sometido a ningún tratamiento antes. El anticuerpo Hu23F4-27 se administró mediante inyección de bolo intravenosa al mono cynomolgus a diferentes dosis de 0,4 mg/kg, 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Las muestras de plasma se recogieron en puntos de tiempo seleccionados hasta 28 días después de la dosificación, y la concentración de la proteína respectiva se determinó mediante ELISA. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon luego utilizando un enfoque no compartimental con WinNonlin (Certara, CA) y se muestran a continuación en la **Figura 12**.

Grupo (n=2)	T _{1/2} (h)	C _{max} (µg/ml)	AUC _{0-t} (día*µg/ml)	AUC _{inf} (día*µg/ml)	CL (ml/hr/kg)
10 mg/kg	121,4±11,4	432,2±31,7	1254,5±38,3	1276,1±48,6	0,327±0,012
2 mg/kg	220,7±94,8	74,1±8,3	280,3±46,3	311,4±76,6	0,276±0,068
0,4 mg/kg	178,2±4,8	11,1±4,6	49,4±1,9	52,9±1,7	0,315±0,010

* * *

[0193] La presente divulgación no debe estar limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas anteriormente, que pretenden ser ilustraciones únicas de aspectos individuales de la divulgación. Cualquier composición o método que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de esta divulgación. Será evidente para los expertos versados en la materia que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones en los métodos y composiciones de la presente divulgación, sin apartarse del espíritu o alcance de la misma. Por lo tanto, se pretende que la presente divulgación cubra las modificaciones y variaciones de ésta, siempre que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

[0194] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta descripción se incorporan aquí como referencia, en la misma medida que, si cada publicación individual o solicitud de patente estuviera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada como referencia.