

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 343**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2017** **PCT/CN2017/102057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018** **WO18050111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2017** **E 17840546 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021** **EP 3328887**

54 Título: **Anticuerpos anti-GM-CSF y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.09.2016 CN 201610831525

19.09.2016 CN 201610832677

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2021

73 Titular/es:

I-MAB BIOPHARMA (HANGZHOU) CO., LTD.
(100.0%)

6F, No.3 Bld., Hexiang Technology Center,
Qiantang New Area
Hangzhou, Zhejiang, CN

72 Inventor/es:

WANG, ZHENGYI;
FANG, LEI;
GUO, BINGSHI y
ZANG, JINGWU

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 887 343 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-GM-CSF y usos de los mismos

5 Antecedentes

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 glucoproteína monomérica secretada por macrófagos, linfocitos T, mastocitos, células NK, células endoteliales y fibroblastos que actúa como una citocina. Los análogos farmacéuticos de GM-CSF natural también se denominan sargramostim y molgramostim. A diferencia del factor estimulante de colonias de granulocitos, que promueve específicamente la proliferación y la maduración de neutrófilos, el GM-CSF afecta a más tipos de células, especialmente a macrófagos y eosinófilos.

El GM-CSF es una glucoproteína monomérica que actúa como una citocina. El GM-CSF estimula a las células madre para producir granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos. Los monocitos salen a la circulación y migran al tejido, tras lo cual maduran en macrófagos y células dendríticas. Por lo tanto, es parte de la cascada inmunitaria/inflamatoria, por la cual la activación de un pequeño número de macrófagos puede conducir rápidamente a un aumento en sus números, un proceso crucial para combatir la infección. El GM-CSF también tiene algunos efectos sobre las células maduras del sistema inmunitario. Estos incluyen, por ejemplo, inhibir la migración de neutrófilos y causar una alteración de los receptores expresados sobre las superficies celulares.

El GM-CSF transmite señales por el transductor de señales y activador de la transcripción, STAT5. En macrófagos, también se ha mostrado que transmite señales por STAT3. La citocina activa macrófagos para inhibir la supervivencia fúngica. Induce la privación en cinc libre intracelular y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno que culminan en privación de cinc fúngico y toxicidad. Por lo tanto, el GM-CSF facilita el desarrollo del sistema inmunitario y promueve la defensa contra infecciones. El GM-CSF también desempeña una función en el desarrollo embrionario funcionando como una embrioquina producida por el aparato reproductor.

El GM-CSF se fabrica usando tecnología de ADN recombinante y se comercializa como una proteína terapéutica denominada molgramostim o, cuando la proteína se expresa en células de levadura, sargramostim. Se usa como una medicación para estimular la producción de glóbulos blancos y así prevenir la neutropenia tras la quimioterapia. El GM-CSF también se ha evaluado en ensayos clínicos por su potencial como un adyuvante para vacunas en pacientes infectados por el VIH.

La inhibición de GM-CSF, por el contrario, puede ser útil para el tratamiento de enfermedades, tales como enfermedades inflamatorias y trastornos autoinmunitarios que incluyen artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM) y psoriasis en placas. La inhibición de GM-CSF también puede ser útil para el tratamiento de cáncer.

Constantinescu et al., Neurology - Neuroimmunology & Neuroinflammation. 2015; 2(4): e117 describe un ensayo aleatorizado de fase 1b de MOR103, un anticuerpo humano contra GM-CSF, en la esclerosis múltiple.

El documento de patente WO 2008/141391 describe anticuerpos que se unen, interactúan o se asocian de otro modo con GM-CSF o un fragmento, porción o parte del mismo y antagonizan o neutralizan la actividad de GM-CSF.

El documento de patente WO 2010/124163 describe un anticuerpo monoclonal humano neutralizante de GM-CSF, 1783J22, así como métodos de preparación y uso del mismo.

El documento de patente WO 2010/071923 describe antagonistas de GM-CSF para su uso en el tratamiento de dolor, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos específicos para GM-CSF o el receptor de GM-CSF.

El documento de patente WO 2015/028657 describe anticuerpos neutralizantes de GM-CSF y composiciones que comprenden los mismos para su uso en el tratamiento de dolor o trastornos inflamatorios (tales como artritis reumatoide) según una pauta posológica específica.

El documento de patente WO 2007/092939 describe péptidos GM-CSF antigénicos y anticuerpos contra GM-CSF.

El documento de patente WO 2008/064321 describe métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas usando un antagonista de GM-CSF.

El documento de patente US 8.268.311 describe proteínas de unión al antígeno que se unen a la proteína GM-CSF humana.

El documento de patente WO 2014/138862 describe anticuerpos monoclonales humanos que neutralizan la bioactividad de GM-CSF y métodos y usos de los mismos.

El documento de patente EP 2535353 describe anticuerpos monoclonales que se unen a hGM-CSF y composiciones

médicas que comprenden los mismos.

El documento de patente WO 2011/153592 describe anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a GM-CSF humano o un fragmento del mismo.

El documento de patente US 2014/065163 describe anticuerpos con especificidad por GM-CSF.

Pujlic et al., European Journal of Pharmacology. 2007; 557(2-3): 230-235 describe la inhibición de inflamación de pulmón inducida por lipopolisacáridos por neutralización de GM-CSF.

Krinner et al., Molecular Immunology. 2007; 44(5): 916-925 describe las propiedades biofísicas y biológicas de un anticuerpo IgG1 anti-GM-CSF humano designado MT203.

Frank Behrens et al., Arthritis & Rheumatism; reunión científica anual del Colegio Estadounidense de Reumatología y la Asociación de Reumatología; Washington DC, 10-14 de noviembre de 2012; 64(12): 4171-4172 describen los resultados de un ensayo aleatorizado de fase 1b/2a, con doble ocultación y controlado por placebo de un anticuerpo monoclonal anti-GM-CSF (MOR103) en artritis reumatoide activa.

Shiomi et al., Inflammation and Regeneration. 2016; 36(8): 1-9 resume resultados referentes a GM-CSF e información de ensayos clínicos que se dirigen a GM-CSF en enfermedades autoinmunitarias.

Hamilton, Trends in Immunology. 2002; 23(8): 403-408 revisa la función de GM-CSF en la inflamación y la autoinmunidad.

Sumario

La presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-GM-CSF que tiene alta afinidad de unión por proteínas GM-CSF humanas y que tiene potentes actividades de inhibición de la unión de GM-CSF a su receptor. Estos anticuerpos anti-GM-CSF son útiles para fines terapéuticos, tales como el tratamiento de diversos tipos de enfermedades inflamatorias, trastornos autoinmunitarios y cánceres, y también se pueden usar para fines de diagnóstico y pronóstico.

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que tiene especificidad por una proteína GM-CSF humana, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

El anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la invención tiene especificidad por una proteína GM-CSF humana y comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 1, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 2, una CDR3 VH de SEQ ID NO: 3, una CDR1 VL de SEQ ID NO: 4, una CDR2 VL de SEQ ID NO: 5 y una CDR3 VL de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende además una región constante de la cadena pesada, una región constante de la cadena ligera, una región Fc, o la combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena ligera 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.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado. El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende Glu en la posición 1, Arg en la posición 98, Ser en la posición 72, según la numeración de Kabat.

La región variable de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención comprende GYTFT (SEQ ID NO: 43) que empieza en la posición 26 según la numeración de Kabat.

El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención comprende una región variable de la cadena ligera: (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 (e) Phe en la posición 87, según la numeración de Kabat.

La presente invención también proporciona uno o más polinucleótidos que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo o fragmento del mismo de la invención.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo tiene especificidad por una proteína GM-CSF humana y comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 23, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 24, una CDR3 VH de SEQ ID NO: 25, una CDR1 VL de SEQ ID NO: 26, una CDR2 VL de SEQ ID NO: 27 y una CDR3 VL de SEQ ID NO: 28. El anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender además una región constante de la cadena pesada, una región constante de la cadena

ligera, una región Fc, o la combinación de las mismas. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante de cadena kappa o lambda. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser de un isotipo de IgG, IgM, IgA, IgE o IgD. El isotipo puede ser IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.

El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo humanizado. El anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en E1, R84, Y27, 128, 148, T68, L70 o T30, según la numeración de Kabat, y combinaciones de los mismos.

La región variable de la cadena pesada puede comprender un fragmento de GYIFT (SEQ ID NO: 44), GYIFS (SEQ ID NO: 45) o GGTFS (SEQ ID NO: 46) que empieza en la posición 26 según la numeración de Kabat.

El anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: V48, D57, Q70 o S43, según la numeración de Kabat, y combinaciones de los mismos.

El anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29-35, o un péptido que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29-35. La región variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 o 35.

El anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36-41, o un péptido que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36-41. La región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38 o 39.

La región variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y la región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. La región variable de la cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y la región variable de la cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo biespecífico o fragmento variable monocatenario.

La presente invención proporciona además una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describe en el presente documento una célula aislada que comprende uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente divulgación.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención o la composición de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria en un paciente en necesidad del mismo. En una realización, la enfermedad o afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en 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 eritematoso sistémico (LES), nefritis, enfermedad de Parkinson (EP), vasculitis y colitis ulcerosa. En una realización, la enfermedad o afección autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en *alopecia areata*, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, dermatomiositis, diabetes (tipo 1), celiaquía, artritis idiopática juvenil autoinmunitaria, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia grave, miocarditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia/esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, uveítis autoinmunitaria, vitiligo y granulomatosis con poliangitis (Wegener).

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención o la composición de la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente en necesidad del mismo. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

La presente invención proporciona además un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención o la composición de la invención para su uso en reducir o aliviar el dolor en un paciente en necesidad del mismo.

También se describe en el presente documento un método de detección de la expresión de GM-CSF en una

muestra, que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo o fragmento del mismo en condiciones tales 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.

5 Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** muestra los resultados de ensayos de unión de ELISA de confirmación para seleccionar clones de hibridoma primarios para la subclonación.

10 La **FIG. 2** muestra los resultados de ensayos de unión de ELISA de confirmación para seleccionar clones de hibridoma primarios para la subclonación.

La **FIG. 3** muestra la unión dependiente de la dosis de los anticuerpos de prueba contra GM-CSF humano.

15 La **FIG. 4** representa la unión cinética de anticuerpos con GM-CSF humano recombinante.

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

20 La **FIG. 6** muestra que los anticuerpos disminuyeron significativamente el nivel de activación de pSTAT5 inducida por GM-CSF.

La **FIG. 7** muestra la inhibición de la proliferación de TF-1 dependiente de GM-CSF por los anticuerpos.

25 La **FIG. 8** muestra que todos los anticuerpos humanizados demostraron una potente potencia de unión contra GM-CSF humano.

La **FIG. 9** muestra que algunos anticuerpos humanizados presentaron la inhibición más fuerte de la proliferación de TF-1.

30 La **FIG. 10** muestra que los anticuerpos probados bloquearon eficazmente la señalización de pSTAT5.

La **FIG. 11** muestra la unión dependiente de la dosis de los anticuerpos a GM-CSF de macaco de la India.

35 La **FIG. 12** representa los parámetros farmacocinéticos de Hu23F4-27.

Descripción detallada

Definiciones

40 Se debe observar que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un anticuerpo" representa uno o más anticuerpos. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en el presente documento.

45 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" pretende englobar un "polipéptido" en singular, así como "polipéptidos" en plural, y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) linealmente unidos 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 de producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácido", o cualquier otro término
50 usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o indistintamente, con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, que incluyen, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos no
55 naturales. Un polipéptido se puede obtener de una fuente biológica natural o producir por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Se puede generar de cualquier manera, que incluye por síntesis química.

El término "aislado", como se usa en el presente documento con respecto a células, ácidos nucleicos, tales como
60 ADN o 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 vírico o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Además, un "ácido nucleico aislado" pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no
65 existen de forma natural 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 se aíslan de otras proteínas o tejidos

celulares. Se indica que los polipéptidos aislados engloban tanto polipéptidos purificados como recombinantes.

Como se usa en el presente documento, el término "recombinante", como se refiere a polipéptidos o polinucleótidos, se refiere a una forma del polipéptido o polinucleótido que no existe naturalmente, un ejemplo no limitante del cual se puede crear combinando los polinucleótidos o polipéptidos que normalmente no se encontrarían juntos.

"Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a similitud de secuencias entre dos péptidos o entre dos moléculas del ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para 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 correspondientes u homólogas compartidas por las secuencias. Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte menos del 40 % de identidad, aunque preferentemente menos del 25 % de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

Una región de polinucleótidos o polinucleótidos (o una región de polipéptidos o polipéptidos) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) es el mismo al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology. Preferentemente, se usan parámetros por defecto para el alineamiento. Un programa de alineamiento es BLAST, que usa parámetros por defecto. En particular, los programas son BLASTN y BLASTP, usando los siguientes parámetros por defecto: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; valor esperado = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; clasificar por = PUNTUACIÓN ALTA; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS traducciones + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los polinucleótidos biológicamente equivalentes son los que tienen el porcentaje de homología especificado anteriormente indicado y que codifican un polipéptido que tiene la misma actividad biológica o similar.

El término "un ácido nucleico o polinucleótido equivalente" se refiere 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 complemento del mismo. Un homólogo de un ácido nucleico bicatenario pretende incluir ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología con o con el complemento del mismo. En un aspecto, los homólogos de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse con el ácido nucleico o complemento del mismo. Asimismo, "un polipéptido equivalente" se refiere a un polipéptido que tiene un 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 combinaciones de los mismos en comparación con el polipéptido o polinucleótido de referencia. En algunos aspectos, la secuencia equivalente retiene la actividad (por ejemplo, unión al epítipo) o estructura (por ejemplo, puente salino) de la secuencia de referencia.

Las reacciones de hibridación se pueden realizar en condiciones de diferente "rigurosidad". En general, se lleva a cabo una reacción de hibridación de baja rigurosidad a aproximadamente 40 °C en aproximadamente 10 x SSC o una disolución de fuerza iónica/temperatura equivalente. Una hibridación de rigurosidad moderada se realiza normalmente a aproximadamente 50 °C en aproximadamente 6 x SSC, y una reacción de hibridación de alta rigurosidad se realiza, en general, a aproximadamente 60 °C en aproximadamente 1 x SSC. Las reacciones de hibridación también se pueden realizar en "condiciones fisiológicas" que son bien conocidas por un experto en la técnica. Un ejemplo no limitante de una condición fisiológica es la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la concentración de Mg^{2+} normalmente encontrada en una célula.

Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) por 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 ser la entrada en bases de datos en un ordenador que tiene una unidad de procesamiento central y se usa para aplicaciones bioinformáticas, tal como en genómica funcional y búsqueda de homología. El término "polimorfismo" se refiere a la coexistencia de más de una forma de un gen o porción del mismo. Una porción de un gen del que hay al menos dos formas diferentes, es decir, dos secuencias de nucleótidos diferentes, se denomina una "región polimórfica de un gen". Una región polimórfica puede ser un único nucleótido, cuya identidad se diferencia en diferentes alelos.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Lo siguiente son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, marca EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, ARNbc, ARNip, miARN, 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, se pueden conferir modificaciones a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marca. El término también se refiere a tanto moléculas bi- como monocatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de la presente divulgación que es un polinucleótido engloba tanto la forma bicatenaria como cada una de dos formas monocatenarias complementarias conocidas o que se predice que constituyen la forma bicatenaria.

El término "codificar", como se aplica a polinucleótidos, se refiere a un polinucleótido que se dice que "codifica" un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, se puede transcribir y/o traducir para producir el ARNm para el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena no codificante es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante se puede deducir de la misma.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" o "polipéptido de unión al antígeno" se refiere a un polipéptido o un complejo de polipéptido que reconoce específicamente un antígeno y se une a él. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo y cualquier fragmento de unión al antígeno o una única cadena del mismo. Por lo tanto, el término "anticuerpo" incluye cualquier proteína o péptido que contiene una molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene actividad biológica de unión al antígeno. Ejemplos de aquellos incluyen, pero no se limitan a, una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión al ligando de la misma, una región variable de la cadena pesada o la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o la cadena ligera, una región estructural (FR), o cualquier porción de las mismas, o al menos una porción de una proteína de unión.

Los términos "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión al antígeno", como se usan en el presente documento, es 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, spiegelmeros y diacuerpos. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o manipulada genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo.

Un "fragmento variable monocatenario" o "scFv" se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas (V_H) y ligeras (V_L) de inmunoglobulinas. En algunos aspectos, las regiones están conectadas con un péptido conector corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El conector puede ser rico en glicina para su flexibilidad, así como serina o treonina para su solubilidad, y se puede o conectar al extremo N de V_H con el extremo C de V_L, o viceversa. Esta proteína retiene la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la retirada de las regiones constantes y la introducción del conector. Las moléculas scFv se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.892.019.

El término anticuerpo engloba diversas amplias clases de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica 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, γ1-γ4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅, etc., están bien caracterizadas y se conoce que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente perceptibles para el experto en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente divulgación. Todas las clases de inmunoglobulina están claramente dentro del alcance de la presente divulgación, la siguiente exposición se referirá, en general, a la clase de IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula habitual de inmunoglobulina comprende dos polipéptidos idénticos de cadena ligera de peso molecular aproximadamente 23.000 Dalton, y dos polipéptidos idénticos de cadena pesada de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas se unen normalmente por enlaces disulfuro en una configuración en "Y", en donde las cadenas ligeras soportan las cadenas pesadas que empiezan en la boca de la "Y" y continúan a través de la región variable.

Los anticuerpos, los polipéptidos de unión al antígeno, las variantes, o derivados de los mismos, de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multispecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión al epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv, Fv monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden o un dominio VK o un VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra los anticuerpos LIGHT desvelados en el presente 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.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (K, λ). Cada clase de cadena pesada se puede unir con una

cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan o por hibridomas, linfocitos B o células hospedadoras manipuladas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van de un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración en Y al extremo C en la parte inferior de cada cadena.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de tanto las porciones de cadena ligera (VK) como pesada (VH) determinan el reconocimiento del antígeno y la especificidad. En cambio, los dominios constantes de la cadena ligera (CK) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento, y similares. Por convenio, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales desde el sitio de unión al antígeno o extremo amino del anticuerpo. La porción del extremo N es una región variable y en la porción del extremo C está una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden en realidad el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se indica anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente epítopes sobre antígenos y se una específicamente a ellos. Es decir, se combinan el dominio VK y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria 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 CDR sobre 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 camélido o manipuladas basándose en inmunoglobulinas de camélido, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir en cadenas pesadas solo, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993).

En anticuerpos naturales, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias de aminoácidos no contiguas cortas que están situadas específicamente para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de aminoácidos en los dominios de unión al antígeno, denominadas las "regiones estructurales", muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones estructurales adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Por lo tanto, las regiones estructurales actúan formando un armazón que proporciona el posicionamiento de las CDR en orientación correcta por interacciones intercatenarias no covalentes. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítopo sobre el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo con su epítopo relacionado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones estructurales, respectivamente, pueden ser identificadas fácilmente para cualquier región variable de la cadena pesada o ligera por un experto habitual en la técnica, puesto que se han definido con precisión (véanse "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

En el caso en el que haya dos o más definiciones de un término que se usa y/o está aceptado en la técnica, la definición del término como se usa en el presente documento pretende incluir todos aquellos significados, a menos que se establezca 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 encontrados dentro de la región variable de tanto los polipéptidos de cadena pesada como ligera. Esta región particular se ha descrito 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). Las definiciones de CDR según Kabat y Chothia incluyen solapamientos o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende estar dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Los restos de aminoácidos apropiados que engloban las CDR, como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen en la siguiente tabla como una comparación. Los números exactos de resto que engloban una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar rutinariamente qué restos 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

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias del dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto habitual en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia del dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

Además de la tabla anterior, el sistema de numeración de Kabat describe las regiones CDR del siguiente modo: CDR-H1 empieza en aproximadamente el aminoácido 31 (es decir, aproximadamente 9 restos después del primer resto de cisteína), incluye aproximadamente 5-7 aminoácidos, y termina en el siguiente resto de triptófano. CDR-H2 empieza en el decimoquinto resto después del extremo de CDR-H1, incluye aproximadamente 16-19 aminoácidos, y termina en el siguiente resto de arginina o lisina. CDR-H3 empieza en aproximadamente el trigésimo tercer resto 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. CDR-L1 empieza en aproximadamente el resto 24 (es decir, después de un resto de cisteína); incluye aproximadamente 10-17 restos; y termina en el siguiente resto de triptófano. CDR-L2 empieza en aproximadamente el decimosexto resto después del final de CDR-L1 e incluye aproximadamente 7 restos. CDR-L3 empieza en aproximadamente el trigésimo tercer resto después del extremo de CDR-L2 (es decir, después de un resto de cisteína); incluye aproximadamente 7-11 restos y termina en la secuencia F o W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden ser de cualquier origen animal, que incluye aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de llama, de caballo o de pollo. En otra realización, la región variable puede ser de origen conditio (por ejemplo, de tiburones).

Como se usa en el presente documento, el término "región constante de la cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de la inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una región constante de la cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión al antígeno para su uso en la divulgación puede comprender una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena de polipéptidos 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 de polipéptidos que comprende un dominio CH3. Además, un anticuerpo para su uso en la divulgación puede carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Como se expone anteriormente, se entenderá por un experto habitual en la técnica que la región constante de la cadena pesada se puede modificar de forma que varíe en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina natural.

La región constante de la cadena pesada de un anticuerpo desvelado 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.

Como se usa en el presente documento, el término "región constante de la cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena ligera del anticuerpo. Preferentemente, la región constante de la cadena ligera comprende al menos una de un dominio constante kappa o dominio constante lambda.

Un "par de cadena ligera-pesada" se refiere al conjunto de una cadena ligera y cadena pesada que puede formar un dímero mediante un enlace disulfuro entre el dominio CL de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Como se indicó previamente, se conocen bien las estructuras de subunidad y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "dominio VH" incluye el dominio variable del extremo amino de una cadena pesada de la inmunoglobulina y el término "dominio CH1" incluye el primer dominio (más extremo amino) de la región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y está en el extremo amino con respecto a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de la inmunoglobulina.

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 resto 244 hasta el resto 360 de un anticuerpo

usando esquemas de numeración convencionales (restos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y restos 231-340, sistema de numeración EU; véase Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). El dominio CH2 es único por que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidrato de carbono ramificadas unidas en N se intercalan 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 extremo C de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.

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 con el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, lo que permite así que las dos regiones de unión al antígeno del extremo N se muevan independientemente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998)).

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 naturales, las regiones CH1 y CH2 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 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU).

Como se usa en el presente documento, se mantendrá que el término "anticuerpo quimérico" significa cualquier anticuerpo en donde la región inmunorreactiva o sitio se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada según la presente divulgación) se obtiene de una segunda especie. En ciertas realizaciones, la región de unión o sitio diana será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana.

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de humanización" se calcula determinando el número de diferencias de aminoácidos de la región estructural (es decir, diferencia no de CDR) entre el dominio humanizado y el dominio de línea germinal, restando ese número del número total de aminoácidos, y luego dividiéndolo entre el número total de aminoácidos y multiplicando por 100.

Por "se une específicamente a" o "tiene especificidad por" se indica, en general, que un anticuerpo se une a un epítipo por su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, por su dominio de unión al antígeno, más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se usa en el presente documento para caracterizar la afinidad relativa por la que un cierto anticuerpo se une a un cierto epítipo. Por ejemplo, se puede considerar que el anticuerpo "A" tiene mayor especificidad por un epítipo dado que el anticuerpo "B," o se puede decir que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con mayor especificidad que la que tiene por el epítipo "D" relacionado.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a tanto el tratamiento terapéutico y profiláctico como a las medidas preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico o trastorno no deseado, tal como la progresión de una enfermedad autoinmunitaria. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, reducción del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto si es detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno, así como los propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se va a prevenir la afección o trastorno.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se indica cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea el diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoológico, deportivos o domésticos, tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, vacas, etc.

Como se usa en el presente documento, frases tales como "a un paciente en necesidad de tratamiento" o "un sujeto en necesidad de tratamiento" incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo o composición de la presente divulgación usada, por ejemplo, para detección, para un procedimiento de diagnóstico y/o para tratamiento.

Anticuerpos anti-GM-CSF

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-GM-CSF con alta afinidad por la proteína GM-CSF humana. Los anticuerpos probados presentaron potentes actividades de unión e inhibitoras y son útiles para usos

terapéuticos y diagnósticos. Además de los anticuerpos murinos originales, los humanizados también mostraron una fuerte afinidad de unión por GM-CSF de macaco de la India 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, e inhibió la proliferación de TF-1 dependiente de GM-CSF.

El anticuerpo o fragmento del mismo comprende regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera que comprenden las regiones CDR como se define en SEQ ID NO: 1-6, como se muestra a continuación. La presente divulgación también proporciona un anticuerpo que incluye dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera con las regiones CDR como se define en SEQ ID NO: 23-28, como se muestra a continuación.

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

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

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

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

Como se muestra en los ejemplos experimentales, los anticuerpos que contuvieron estas regiones CDR, tanto de ratón, humanizadas como quiméricas, tuvieron potentes actividades de unión e inhibitoras de GM-CSF. Un anticuerpo anti-GM-CSF de la presente divulgación puede incluir las CDR VH y VL como se enumera en la Tabla 1a-b, con una, dos o tres modificaciones adicionales. Dichas modificaciones pueden ser adición, delección o sustitución de aminoácidos.

La modificación puede ser una sustitución en no más de un resto de cada una de las CDR. La modificación puede ser una sustitución en uno, dos o tres restos. La modificación puede ser una sustitución en uno de los restos. Dichas sustituciones pueden ser sustituciones conservativas.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina se sustituye preferentemente por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Una hilera de aminoácidos se puede sustituir con una hilera estructuralmente similar que se diferencia en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadena lateral.

Ejemplos no limitantes de sustituciones de aminoácidos conservativas se proporcionan en la siguiente tabla, donde una puntuación de similitud 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 de aminoácidos conservativas

Para el aminoácido	Sustitución con
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, alo-Thr, L-Cys, D-Cys
Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, alo-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

5 Un anticuerpo o fragmento del mismo puede incluir no más de uno, no más de dos, o no más de tres de las sustituciones anteriores.

10 El anticuerpo o fragmento del mismo de la invención tiene especificidad por una proteína GM-CSF humana y comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 1, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 2, una CDR3 VH de SEQ ID NO: 3, una CDR1 VL de SEQ ID NO: 4, una CDR2 VL de SEQ ID NO: 5 y una CDR3 VL de SEQ ID NO: 6. Los ejemplos no limitantes de VH se proporcionan en SEQ ID NO: 7-17, de las que SEQ ID NO: 7 es VH de ratón y SEQ ID NO: 8-17 son humanizadas. Además, estas VH humanizadas incluyen una o más retromutaciones a la versión de ratón. Asimismo, los ejemplos no limitantes de VL (VK) se proporcionan en SEQ ID NO: 18-22. SEQ ID NO: 18 es una secuencia de ratón, y SEQ ID NO: 19-22 son secuencias humanizadas, entre las que SEQ ID NO: 20-22 incluyen una o más retromutaciones, como se muestra en los ejemplos.

20 Se muestra que las retromutaciones son útiles para retener ciertas características de los anticuerpos anti-GM-CSF. Por consiguiente, los anticuerpos anti-GM-CSF de la presente invención incluyen una o más de las retromutaciones. La retromutación de VH (es decir, el aminoácido incluido en la posición especificada) puede ser una o más seleccionadas 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), según la numeración de Kabat, y combinaciones de las mismas.

El anticuerpo humanizado puede incluir al menos la retromutación de VH E1. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH E1 y R98. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH E1 y otras que se enumeraron anteriormente. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos el grupo de retromutaciones de VH (E1, R98 y S72), (E1, R98, S72 y A68), (E1, R98, S72, A68, L70 y 148), (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). El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención incluye el grupo de retromutaciones de VH E1, R98 y S72.

La región variable de la cadena pesada puede comprender un fragmento de DYTLT (SEQ ID NO: 42) o GYTFT (SEQ ID NO: 43) en el extremo N de CDR1, es decir, que empieza en la posición 26 según la numeración de Kabat. La región variable de la cadena pesada puede comprender DYTLT (SEQ ID NO: 42). La región variable de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención comprende GYTFT (SEQ ID NO: 43).

El anticuerpo humanizado puede incluir una o más de las retromutaciones. La retromutación de VL puede ser 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), según la numeración de Kabat, y combinaciones de las mismas.

El anticuerpo humanizado puede incluir al menos dos, tres o cuatro de las retromutaciones de VL A46, D60, D70, S43 o F87. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos la retromutación de VL A46. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VL A46 y D60 y otras que se enumeraron anteriormente. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos el grupo de retromutaciones de VL (A46, D60 y D70) o (A46, D60, D70, S43 y F87). El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención incluye el grupo de retromutaciones de VL A46, D60, D70, S43 y F87.

El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH (E1, R98, S72, A68, L70 y 148) y no las retromutaciones de VL. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH (E1, S72, L70, I48, A68, D26 y L29) y no las retromutaciones de VL. El anticuerpo humanizado incluye al menos las retromutaciones de VH (E1 y S72) y las retromutaciones de VL (A46, D60, D70, S43 y F87). El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención incluye el grupo de retromutaciones de VH E1, R98 y S72 y el grupo de retromutaciones de VL A46, D60, D70, S43 y F87.

El anticuerpo anti-GM-CSF de la presente divulgación incluye un VH de SEQ ID NO: 8-17 y un VL de SEQ ID NO: 19-22, o sus equivalentes biológicos respectivos. Un equivalente biológico de VH o VL es una secuencia que incluye los aminoácidos designados, mientras que tiene un total de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Un equivalente biológico de SEQ ID NO: 10 puede ser, por lo tanto, un VH que tiene un total de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10, pero retiene las CDR (SEQ ID NO: 1-3 o sus variantes), y opcionalmente retiene una o más, o todas las retromutaciones.

VH puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y VL tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. VH puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y VL puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. VH puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y VL puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. Según la presente divulgación, se señala que cada una de las secuencias citadas también se puede sustituir con sus equivalentes biológicos.

En el presente documento se describe además un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene especificidad por una proteína GM-CSF humana y comprende una CDR1 VH de SEQ ID NO: 23, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 24, una CDR3 VH de SEQ ID NO: 25, una CDR1 VL de SEQ ID NO: 26, una CDR2 VL de SEQ ID NO: 27 y una CDR3 VL de SEQ ID NO: 28. Los ejemplos no limitantes de VH se proporcionan en SEQ ID NO: 29-35, de las que SEQ ID NO: 29 es VH de ratón y SEQ ID NO: 30-35 son las humanizadas. Además, estas VH humanizadas incluyen una o más retromutaciones a la versión de ratón. Asimismo, se proporcionan ejemplos no limitantes de VL (VK) en SEQ ID NO: 36-41. SEQ ID NO: 36 es una secuencia de ratón, y SEQ ID NO: 37-41 son secuencias humanizadas, entre las que SEQ ID NO: 38-41 incluyen una o más retromutaciones, como se muestra en los ejemplos.

Se muestra que las retromutaciones son útiles para retener ciertas características de los anticuerpos anti-GM-CSF. Por consiguiente, los anticuerpos anti-GM-CSF de la presente divulgación, en particular los humanos o humanizados, incluyen una o más de las retromutaciones. La retromutación de VH (es decir, el aminoácido incluido en la posición especificada) puede ser una o más seleccionadas de E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 o T30, según la numeración de Kabat, y combinaciones de las mismas.

El anticuerpo humanizado puede incluir al menos la retromutación de VH E1. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH E1 y R84. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH E1 y otras que se enumeraron anteriormente. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos el grupo de retromutaciones de VH (E1), (E1 y R84), (E1, R84, Y27 y 128), (E1, R84, Y27, I28 y 148), (E1, R84, Y27, I28, I48,

T68 y L70) o (E1, R84, Y27, I28, 148, T68, L70 y T30).

La región variable de la cadena pesada puede comprender un fragmento de GYIFT (SEQ ID NO: 44), GYIFS (SEQ ID NO: 45) o GGTFS (SEQ ID NO: 46) en el extremo N de CDR1, es decir, que empieza en la posición 26 según la numeración de Kabat. La región variable de la cadena pesada puede comprender GYIFT (SEQ ID NO: 44). La región variable de la cadena pesada puede comprender GYIFS (SEQ ID NO: 45). La región variable de la cadena pesada puede comprender GGTFS (SEQ ID NO: 46).

El anticuerpo humanizado puede incluir una o más de las retromutaciones. La retromutación de VL puede ser una o más seleccionadas de V48, D57, Q70 o S43, según la numeración de Kabat, y combinaciones de las mismas.

El anticuerpo humanizado puede incluir al menos dos, tres o cuatro de las retromutaciones de VL V48, D57, Q70 o S43. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos la retromutación de VL V48. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VL V48 y D57 y otras que se enumeraron anteriormente. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos el grupo de retromutaciones de VL (V48), (V48 y D57), (V48, D57 y Q70) o (V48, D57, Q70 y S43).

El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH (E1, R84, Y27, I28, 148, T68 y L70) y la retromutación de VL V48. El anticuerpo humanizado puede incluir al menos las retromutaciones de VH (E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 y T30) y las retromutaciones de VL (V48 y D57).

El anticuerpo anti-GM-CSF de la presente divulgación puede incluir un VH de SEQ ID NO: 30-35 y un VL de SEQ ID NO: 37-41, o sus equivalentes biológicos respectivos. Un equivalente biológico de un VH o VL es una secuencia que incluye los aminoácidos designados, mientras que tiene un total de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Un equivalente biológico de SEQ ID NO: 35, por lo tanto, pueden ser un VH que tiene un total de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 35, pero retiene las CDR (SEQ ID NO: 23-25 o sus variantes), y opcionalmente retiene una o más, o todas las retromutaciones.

VH puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 y VL puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38. VH puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y VL puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 39. Se señala que cada una de las secuencias citadas también se puede sustituir con sus equivalentes biológicos.

También se entenderá por un experto habitual en la técnica que los anticuerpos como se desvela en el presente documento se pueden modificar de forma que varíen en la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión natural del que derivaron. 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 partida, por ejemplo, puede ser 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de partida.

Los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación pueden ser anticuerpos o fragmentos monoespecíficos o biespecíficos, en algunas realizaciones. Para un anticuerpo biespecífico, la otra especificidad puede ser por un epítipo diana diferente de GM-CSF o una proteína diana diferente que es útil para un uso particular, por ejemplo, uso terapéutico. En un aspecto, la proteína diana es una citocina, tal como TNF-alfa, IL-6, IL-1 e IL-17. En otro aspecto, la proteína diana es una quimiocina, tal como CCL2, CXCL12 y CXCL13. En otro aspecto, la proteína diana es una proteína de la superficie celular, tal como CD3, CSF-1R, CD20 y CD73.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos normalmente no asociados a un anticuerpo. Las modificaciones a modo de ejemplo se describen más abajo en más detalle. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una secuencia conectora flexible, o se puede modificar para añadir un resto funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o una marca).

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 forma que la unión covalente no evite que el anticuerpo se una al epítipo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos se pueden modificar, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace con un ligando celular u otra proteína, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden conjugar o conectar por otros medios con otra molécula para formar una molécula 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 citocinas u otros factores solubles, tales como IL-10, IL-25, IL-27, IL-33, IL-35 e IL-36. También se proporcionan, en algunas realizaciones, conjugados de anticuerpo-fármaco que incluyen un anticuerpo o fragmento de la presente invención y un fármaco de molécula pequeña.

Los anticuerpos se pueden conjugar o fusionar con un agente terapéutico, que puede incluir marcas detectables, tales como marcas radiactivas, un inmunomodulador, una hormona, una enzima, un oligonucleótido, un terapéutico fotoactivo o agente de diagnóstico, un agente citotóxico, que puede ser un fármaco o una toxina, un agente potenciador de ultrasonidos, una marca no radiactiva, una combinación de los mismos y otros agentes de este tipo conocidos en la técnica.

Los anticuerpos pueden ser marcados detectablemente acoplándolos con un compuesto quimioluminiscente. La presencia del polipéptido de unión al antígeno marcado de forma quimioluminiscente se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de marca quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Los anticuerpos también pueden ser marcados detectablemente usando metales emisores de fluorescencia, tales como ¹⁵²Eu, u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo usando dichos grupos quelantes metálicos como ácido dietilentriaminapentacético (DTPA) o ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). Se conocen bien las técnicas para conjugar diversos restos con un anticuerpo, véanse, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en 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 (2ª 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 anticuerpos

La presente invención proporciona uno o más polinucleótidos que codifican las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo o el fragmento del mismo de la invención. La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados o moléculas de ácidos nucleicos 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 las cadenas pesadas y ligeras de los polipéptidos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótidos separadas. Además, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar porciones de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los polipéptidos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótidos separadas.

Se conocen bien en la técnica los métodos de preparación de anticuerpos y se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, tanto las regiones variables como constantes de los polipéptidos de unión al antígeno de la presente divulgación son completamente humanos. Los anticuerpos completamente humanos se pueden preparar usando técnicas descritas en la técnica y como se describen en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos completamente humanos contra un antígeno específico se pueden preparar administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a una provocación antigénica, pero cuyos loci endógenos se han invalidado. Las técnicas a modo de ejemplo que se pueden usar para preparar dichos anticuerpos se describen en las patentes de EE. UU.: 6.150.584; 6.458.592; 6.420.140.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos preparados no provocarán una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal que se va a tratar, por ejemplo, en un humano. En una realización, los polipéptidos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la divulgación se modifican para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden humanizar, primatizar, desinmunizar o se pueden preparar anticuerpos quiméricos. Estos tipos de anticuerpos derivan de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo murino o primate, que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto se puede lograr por diversos métodos, que incluyen (a) injertar todos los dominios variables no humanos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injertar al menos una parte de una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas en una región estructural humana y regiones constantes con o sin retención de restos críticos de la región estructural; o (c) trasplantar todos los dominios variables no humanos, pero "ocultarlos" con una sección de tipo humana por sustitución de restos de superficie. Dichos métodos se desvelan en Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 25:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994), y las patentes de EE. UU. N.º: 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.190.370.

También se puede usar para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítopes de linfocitos T (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud internacional N.º: WO/9852976 A1 y WO/0034317 A2). Por

ejemplo, se analizan las secuencias de la cadena pesada variable y de la cadena ligera variable del anticuerpo de partida y se crea un "mapa" de epítopes de linfocitos T humanos de cada región V que muestra la localización de epítopes en relación con regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros restos clave dentro de la secuencia. Los epítopes de linfocitos T individuales del mapa de epítopes de linfocitos T se analizan para identificar sustituciones alternativas de aminoácidos con un bajo riesgo de alteración de la actividad del anticuerpo final. Se diseña una variedad de secuencias pesadas variables y ligeras variables alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en una variedad de polipéptidos de unión. Normalmente, se generan entre 12 y 24 anticuerpos de variante y se prueban para la unión y/o función. Los genes de la cadena pesada y ligera completos que comprenden regiones variables modificadas y constantes humanas se clonan entonces en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpo completo. Los anticuerpos se comparan entonces en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

La especificidad de unión de los polipéptidos de unión al antígeno de la presente divulgación se puede determinar por ensayos *in vitro*, tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

Alternativamente, se pueden adaptar las técnicas descritas para la producción de unidades monocatenarias (la patente de EE. UU. N.º 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)) para producir unidades monocatenarias de la presente divulgación. Las unidades monocatenarias se forman uniendo fragmentos de la cadena pesada y ligera de la región Fv por un puente de aminoácidos, dando como resultado un péptido de fusión monocatenario. También se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988)).

Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv monocatenarios (scFv) y anticuerpos incluyen los descritos en las patentes de EE. UU. N.º 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, que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y los 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 derivan de diferentes especies de animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos quiméricos. 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); las patentes de EE. UU. N.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

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 la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los restos de la región estructural en las regiones estructurales humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de la región estructural se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por modelado de las interacciones del CDR y restos de la región estructural para identificar restos de la región estructural importantes para la unión al antígeno y comparación de secuencias para identificar restos poco usuales de la región estructural en las posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen et al., la patente de EE. UU. N.º 5.585.089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento de patente EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; las patentes de EE. UU. N.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), inactivación o acondicionamiento superficial (documentos de patente 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 barajado de cadenas (patente de EE. UU. N.º 5.565.332).

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen los métodos de presentación en fagos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse, por lo tanto, las patentes de EE. UU. N.º 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.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de la inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera humana se pueden introducir aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad se pueden introducir en células madre embrionarias de ratón, además de los genes de la cadena pesada y ligera humana. Los genes de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera de ratón se pueden convertir en no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción

de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH previene la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Entonces se crían ratones quiméricos para producir descendencia homocigótica que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan en el modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido diana deseado. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase 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, véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; las patentes de EE. UU. N.º 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. Además, se puede tratar a empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) y GenPharm (San Jose, Calif.) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado también se pueden generar usando una técnica, denominada "selección guiada". En este enfoque se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespersen et al., *Bio/Technology* 72:899-903 (1988). Véase, por lo tanto, la patente de EE. UU. N.º 5.565.332).

En otra realización, se pueden aislar y secuenciar fácilmente anticuerpos monoclonales que codifican ADN deseados usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven de fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que luego se transfectan en células procariotas u eucariotas hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo 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 la región constante y variable para la fabricación anticuerpos como se describe en Newman et al., la patente de EE. UU. N.º 5.658.570, presentada el 25 de enero de 1995. Esencialmente, esto implica la extracción de ARN de las células seleccionadas, la conversión en ADNc y la amplificación por PCR usando cebadores específicos de Ig. Los cebadores adecuados para este fin también se describen en la patente de EE. UU. N.º 5.658.570. Como se tratará más abajo en más detalle, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado se pueden cultivar en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

Además, usando técnicas de ADN recombinante convencionales, una o más de las CDR de los polipéptidos de unión al antígeno de la presente divulgación se pueden insertar dentro de regiones estructurales, por ejemplo, en regiones estructurales humanas para humanizar un anticuerpo no humano. Las regiones estructurales pueden ser regiones estructurales naturales o consenso, y preferentemente regiones estructurales humanas (véase, por ejemplo, Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998) para un listado de regiones estructurales humanas). Preferentemente, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones estructurales y CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de un polipéptido deseado, por ejemplo, LIGHT. Preferentemente, se puede hacer una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones estructurales, y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Además, dichos métodos se pueden usar para hacer sustituciones o delecciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en el enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones al polinucleótido están englobadas por la presente divulgación y están dentro de la experiencia de la técnica.

Además, se pueden usar técnicas desarrolladas 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)) por corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón, de especificidad apropiada por antígenos, 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 derivan de diferentes especies de animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

Otros medios más altamente eficientes para generar anticuerpos recombinantes se desvelan por 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. Además, esta técnica también se describe en las patentes de EE. UU. de cesión común N.º 5.658.570, 5.693.780 y 5.756.096.

Alternativamente, se pueden seleccionar líneas celulares productoras de anticuerpos y cultivar usando técnicas bien conocidas por el experto. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones principales. A este respecto, las técnicas adecuadas para su uso en la divulgación como se describen a continuación se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991).

Además, se pueden usar técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la presente divulgación, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo 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 con respecto a la región de la cadena pesada variable de referencia, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, región de la cadena ligera variable, CDR-L1, CDR-L2 o CDR-L3. Alternativamente, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar para actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad.

Métodos de tratamiento y usos

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 de diagnóstico.

La presente divulgación se refiere 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 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 se limitan a, anticuerpos de la divulgación (incluyendo variantes y derivados de los mismos como se describe en el presente documento) y ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican anticuerpos de la divulgación (incluyendo variantes y derivados de los mismos como se describe en el presente documento).

Los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación se pueden usar para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria o trastorno, o cáncer. También se cree que los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación son útiles para tratar los mecanismos subyacentes de dolor o el dolor en sí.

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) era conocido originalmente por su capacidad para generar colonias de tanto granulocitos como macrófagos de precursores de la médula ósea. También se ha mostrado que actúan sobre células mieloides murinas como factores de pro-supervivencia, activación y diferenciación. Estudios recientes sugieren que el GM-CSF también tiene muchas funciones pro-inflamatorias y desempeña funciones críticas en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias.

El GM-CSF promueve la supervivencia y la activación de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, así como la maduración de células dendríticas (DC). El GM-CSF puede polarizar macrófagos en macrófagos inflamatorios de tipo M1, que produce una variedad de citocinas inflamatorias, tales como TNF, IL-6, IL-12p70, IL-23 o IL-1 β , y así promueve las respuestas de Th1-Th17. Por otra parte, también se informa de la asociación de GM-CSF e inmunidad de Th2 en inflamación alérgica de las vías respiratorias.

El receptor de GM-CSF consiste en una subunidad α que se une a GM-CSF con baja afinidad (GMR α) y una subunidad β c transductora de señales que es compartida con los receptores de IL-3 e IL-5. El complejo binario de GM-CSF y GMR α interactúa con una subunidad β c libre y forma el complejo de hexámero de alta afinidad. Los complejos de dodecámero formados por agregación lateral de dos complejos de hexámero permiten que Jak2 se asocie a una subunidad β c para la dimerización y transfosforilación, pero no lo complejos de hexámero. Esta estructura conduce a respuestas dependientes de la dosis de la activación de receptores de GM-CSF. La baja concentración de GM-CSF, como en la condición normal, provoca la fosforilación de β c Ser585 y activa la vía de cinasa 14-3-3/PI-3 que solo conduce a la supervivencia celular. Una mayor concentración de GM-CSF, como en la afección inflamatoria, inactiva la fosforilación de β c Ser585 y medió en la fosforilación de β c Tyr577 y activación de la vía Jak2/STAT5, vía de proteína cinasa activada por Ras/mitógeno y vía de PI-3 cinasa, dando como resultado la promoción de la supervivencia, proliferación y activación celular.

Una amplia variedad de células pueden producir GM-CSF. Las principales fuentes de GM-CSF son linfocitos T y B, células endoteliales de monocitos/macrófagos y fibroblastos. Los neutrófilos, los eosinófilos, las células epiteliales, las células mesoteliales, las células de Paneth, los condrocitos y las células tumorales también pueden producir GM-CSF. La producción de GM-CSF se estimula por diversos factores, que incluyen TNF, IL-1, agonistas de receptores de tipo toll y prostaglandina E2. Recientemente, la patogenicidad de linfocitos T CD4 productores de GM-CSF en

enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias se aclara y gana cada vez más atención.

Pruebas evidentes revelaron que GM-CSF desempeñó funciones críticas en el desarrollo de muchas enfermedades autoinmunitarias. La reducción o neutralización de GM-CSF suprime muchos modelos de enfermedad autoinmunitaria, que incluyen encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), artritis, enfermedad pulmonar intersticial relacionada con la artritis, nefritis o psoriasis. También se sugiere que la inhibición de GM-CSF puede ser útil para tratar el cáncer.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección inflamatoria que se va a ser tratar por los anticuerpos, fragmentos y composiciones desvelados incluye una o más de 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 eritematoso sistémico (LES), nefritis, enfermedad de Parkinson (EP), vasculitis y colitis ulcerosa.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección autoinmunitaria que se va a tratar por los anticuerpos, fragmentos y composiciones desveladas incluye una o más de *alopecia areata*, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, dermatomiositis, diabetes (tipo 1), celiaquía, artritis idiopática juvenil autoinmunitaria, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia grave, miocarditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia/esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, uveítis autoinmunitaria, vitiligo y granulomatosis con poliangitis (Wegener).

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmunitario crónico que afecta principalmente a las articulaciones. Normalmente da como resultado articulaciones calientes, hinchadas y dolorosas. El dolor y la rigidez empeoran frecuentemente después del descanso. Lo más común, afectan a la muñeca y las manos, afectando a las mismas articulaciones normalmente en ambos lados del cuerpo. La enfermedad también puede afectar a otras partes del cuerpo. Mientras que la causa de la artritis reumatoide no está clara, se cree que implica a una combinación de factores genéticos y ambientales. El mecanismo subyacente implica al sistema inmunitario del cuerpo que ataca a las articulaciones. Esto da como resultado la inflamación y el engrosamiento de la cápsula articular. Los objetivos del tratamiento son reducir el dolor, disminuir la inflamación y mejorar el funcionamiento global de una persona. Se usan frecuentemente medicaciones para el dolor, esteroides y AINE para ayudar con los síntomas. Se puede usar un grupo de medicaciones, denominadas fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), tales como hidroxycicloroquina y metotrexato, para ralentizar la progresión de la enfermedad.

La osteoartritis (OA) es un tipo de enfermedad articular que resulta de la degradación del cartílago articular y del hueso subyacente. Los síntomas más comunes son dolor y rigidez articular. Inicialmente, los síntomas pueden ocurrir solo después del ejercicio, pero con el tiempo pueden llegar a ser constantes. Otros síntomas pueden incluir hinchazón articular, disminución de la amplitud de movimiento y, cuando la espalda está afectada, debilidad o entumecimiento de los brazos y las piernas. Las causas incluyen lesión articular previa, desarrollo anormal de articulaciones o extremidades, y factores hereditarios. El riesgo es mayor en los que tienen sobrepeso, tienen una pierna de longitud diferente y tienen trabajos que dan como resultado altos niveles de esfuerzo articular. Se cree que la osteoartritis se provoca por esfuerzo mecánico en la articulación y procesos inflamatorios leves. El tratamiento incluye ejercicio, esfuerzos para reducir el esfuerzo articular, grupos de ayuda y medicaciones para el dolor.

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 altera la capacidad de partes del sistema nervioso para comunicarse, dando como resultado una variedad de signos y síntomas, que incluyen problemas físicos, mentales y algunas veces psiquiátricos. Los síntomas específicos pueden incluir diplopia, ceguera en un ojo, debilidad muscular, problemas con la sensibilidad o problemas con la coordinación. Mientras que la causa no está clara, se cree que el mecanismo subyacente es o la destrucción por el sistema inmunitario o el fallo 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.

El asma es una enfermedad inflamatoria común crónica de las vías respiratorias de los pulmones. Se caracteriza por síntomas variables y recurrentes, obstrucción reversible de las vías y broncoespasmo. Los síntomas incluyen episodios de sibilancias, tos, opresión torácica y disnea. Se cree que el asma es causado por una combinación de factores genéticos y ambientales. Los factores ambientales incluyen exposición a la contaminación del aire y alérgenos. El asma se clasifica según la frecuencia de los síntomas, volumen espiratorio máximo en un segundo (VEM1) y flujo espiratorio máximo. También se puede clasificar como atópico o no atópico, donde la atopia se refiere a una predisposición hacia el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad de tipo 1. No hay cura para el asma. Los síntomas se pueden prevenir evitando desencadenantes, tales como alérgenos e irritantes, y usando corticosteroides inhalados. Se pueden usar agonistas beta de acción prolongada (LABA) o antileucotrienos, además de corticosteroides inhalados si los síntomas del asma siguen sin estar controlados. El tratamiento de síntomas que empeoran rápidamente es normalmente con un agonista beta-2 de acción corta inhalado, tal como salbutamol y

corticosteroides, tomados por vía oral. En casos muy graves se pueden requerir corticosteroides intravenosos, sulfato de magnesio y hospitalización.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un tipo de enfermedad pulmonar obstructiva caracterizada por un flujo de aire escaso prolongado. La EPOC puede incluir dos afecciones principales, enfisema y bronquitis crónica. En el enfisema, se dañan las paredes entre muchos de los sacos alveolares. Como resultado, los sacos alveolares pierden su forma y se vuelven flácidos. Este daño también puede destruir las paredes de los alveolos, que conduce a menos alveolos y más grandes en lugar de muchos minúsculos. Si esto ocurre, se reduce la cantidad de intercambio de gases en los pulmones. En la bronquitis crónica, el revestimiento de las vías respiratorias permanece constantemente irritado e inflamado, y esto hace que se hinche el revestimiento. Se forma una gran cantidad de moco denso en las vías respiratorias, lo que dificulta respirar. No hay cura para la EPOC, pero los síntomas son tratables y se puede retrasar su progresión.

El dolor es una sensación angustiante causada frecuentemente por estímulos intensos o perjudiciales, tales como golpearse un dedo del pie, quemarse un dedo de la mano, poner alcohol sobre un corte o golpearse el codo. El dolor es un fenómeno complejo y subjetivo, el definir el dolor ha sido un reto. El dolor también se refiere a una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial. El dolor se considera algunas veces como un síntoma de una afección subyacente, tal como inflamación.

En el presente documento se describen métodos de tratamiento de un cáncer en un paciente en necesidad del mismo. El método puede implicar la administración al paciente de una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación.

Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.

Enfermedades o afecciones adicionales asociadas a un aumento de la supervivencia celular, que se puede tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar con los anticuerpos o variantes, o derivados de los mismos de la divulgación, incluyen, pero no se limitan a, progresión, y/o metástasis de tumores malignos y trastornos relacionados, tales como leucemia (incluyendo leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluyendo mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no hodgkina), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de las cadenas pesadas, y tumores sólidos que incluyen, pero no se limitan a, sarcomas y carcinomas, tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Una dosis y pauta de tratamiento específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, que incluyen los anticuerpos particulares, variante o derivado de los mismos usados, la edad del paciente, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta, y el momento de administración, la velocidad de eliminación, la combinación de fármacos y la intensidad de la enfermedad particular que está tratándose. La evaluación de dichos factores por cuidadores médicos está dentro de la experiencia habitual en la técnica. La cantidad también dependerá del paciente individual que se va a tratar, la vía de administración, el tipo de formulación, las características del compuesto usado, la intensidad de la enfermedad y el efecto deseado. La cantidad usada se puede determinar por principios farmacológicos y farmacocinéticos bien conocidos en la técnica.

Los métodos de administración de los anticuerpos, variantes o incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los polipéptidos de unión al antígeno o composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos de unión al antígeno de la divulgación se pueden administrar por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica (como por polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico), por vía bucal, o como un spray oral o nasal.

El término "parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a modos de administración que incluyen inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intrarticular, e infusión.

La administración puede ser sistémica o local. Además, se puede desear introducir los anticuerpos de la divulgación en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal; se puede facilitar la inyección intraventricular por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, por el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización.

Puede ser conveniente administrar los polipéptidos de unión al antígeno o composiciones de la divulgación por vía local al área en necesidad de tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía, administración tópica, por ejemplo, conjuntamente, con un apósito para heridas después de la cirugía, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína, que incluye un anticuerpo, de la divulgación, se debe tener cuidado para usar materiales a los que no se absorbe la proteína.

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

En otra realización más, el polipéptido de unión al antígeno o composición se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véanse 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 (véanse *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 y Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véanse 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, un sistema de liberación controlada se puede colocar en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, por lo que se requiere solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, arriba, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se tratan en la revisión de Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533).

Donde la composición de la divulgación comprende un ácido nucleico o polinucleótido que codifica una proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión del ácido nucleico apropiado y administrándola de manera que llegue a ser intracelular, por ejemplo, por el uso de un vector retroviral (véase la patente de EE. UU. N.º 4.980.286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o administrándola en unión con un péptido de tipo homeocaja que se conoce por entrar en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868), etc. Alternativamente, se puede introducir intracelularmente un ácido nucleico e incorporar dentro de ADN de célula hospedadora para la expresión, por recombinación homóloga.

La cantidad de los anticuerpos de la divulgación que será eficaz en el tratamiento, la inhibición y la prevención de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria, inmunitaria o maligna se puede determinar por técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar en la identificación de intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad, trastorno o afección, y se debe decidir según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Se pueden extrapolar dosis eficaces de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o en modelos animales.

Como una propuesta general, la dosis administrada a un paciente de los polipéptidos de unión al antígeno de la presente divulgación es normalmente 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 semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, frecuentemente es posible dosis más bajas de los anticuerpos humanos y administración menos frecuente. Además, la dosis y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la divulgación se pueden reducir potenciando la captación y penetración tisular (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

Los métodos de tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno infecciosa o maligna que comprenden la administración de un anticuerpo, variante o derivado del mismo de la divulgación se prueban normalmente *in vitro*, y luego *in vivo* en un modelo animal aceptable, para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes del uso en

seres humanos. Los modelos animales adecuados, que incluyen animales transgénicos, se conocen bien por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* para demostrar la utilidad terapéutica del polipéptido de unión al antígeno descrito en el presente documento incluyen el efecto de un polipéptido sobre una línea celular o una muestra de tejido del paciente. El efecto del polipéptido de unión al antígeno sobre la línea celular de unión al antígeno y/o la muestra de tejido se pueden determinar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como los ensayos desvelados en cualquier parte en el presente documento. Según la divulgación, los ensayos *in vitro* que se pueden usar para determinar si se indica la administración de un polipéptido de unión al antígeno específico incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra de tejido del paciente se cultiva en cultivo, y se expone a un compuesto o se le administra de otro modo, y se observa el efecto de dicho compuesto sobre la muestra de tejido.

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 receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

En una realización adicional, las composiciones de la invención se pueden administrar en combinación con un agente antineoplásico, un agente antiviral, agente antibacteriano o antibiótico o agentes antifúngicos. Cualquiera de estos agentes conocidos en la técnica se puede administrar en las composiciones de la presente divulgación.

En otra realización, las composiciones de la invención se pueden administrar en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que se pueden administrar con las composiciones de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, derivados de antibiótico (por ejemplo, doxorubicina, 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, citosina arabinósido, ciclofosfamida, estramustina, hidroxiurea, procarbazona, mitomicina, busulfán, cis-platino y sulfato de vincristina); hormonas (por ejemplo, medroxiprogesterona, fosfato sódico de estramustina, etinilestradiol, estradiol, acetato de megestrol, metiltestosterona, difosfato de dietilestilbestrol, clorotrianiseno y testolactona); derivados de mostaza nitrogenada (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, mecloretamina (mostaza nitrogenada) y tiotepa); esteroides y combinaciones (por ejemplo, fosfato sódico de betametasona); y otros (por ejemplo, dicarbazina, asparaginasa, mitotano, sulfato de vincristina, sulfato de vinblastina y etopósido).

Composiciones y terapias de combinación

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

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), sulindaco (Clinoril), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), oxaprozina (Daypro), tolmetina (Tolmetin Sodium, Tolectin), salsalato (Disalcid), etodolaco (Lodine), fenoprofeno (Nalfon), flurbiprofeno (Ansaid), ketorolaco (Toradol), meclofenamato y ácido mefenámico (Ponstel).

En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es adecuado para tratar una enfermedad autoinmunitaria. Los ejemplos no limitantes incluyen glucocorticoide, anticuerpos anti-CD3, tales como Muromonab-CD3, inhibidores de IL-2a, tales como basiliximab (Simulect) y daclizumab (Zenapax), inhibidores de calcineurina, tales como tacrolimus y ciclosporina, sirolimus, everolimus, interferones, opioides, proteínas o anticuerpos de unión a TNF, y micofenolato.

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

- antimetabolitos/ antineoplásicos, tales como los análogos de pirimidina floxuridina, capecitabina y citarabina;
- análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados;
- agentes antiproliferativos/antimitóticos que incluyen productos naturales, tales como alcaloide de la vinca (vinblastina, vincristina) y microtúbulo, tal como taxano (paclitaxel, docetaxel), vinblastina, nocodazol, epotilonas, vinorelbina (NAVELBINE®) y epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido);
- agentes que dañan el ADN, tales como actinomicina, amsacrina, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (CYTOXAN®), dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, ifosfamida, melfalán, mecloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, procarbazona, taxol, taxotere, tenipósido, etopósido y trietilenofofosforamida;
- antibióticos, tales como dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina;

- enzimas, tales como L-asparaginasa que metaboliza por vía sistémica L-asparagina y priva a las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina;
- antiagregantes plaquetarios;
- agentes alquilantes antiproliferativos/antimitóticos, tales como las mostazas nitrogenadas ciclofosfamida y análogos (melfalán, clorambucilo, hexametilmelamina y tiotepa), alquilnitrosoureas (carmustina) y análogos, estreptozocina y triazenos (dacarbazina);
- antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos, tales como análogos de ácido fólico (metotrexato);
- complejos de coordinación de platino (cisplatino, oxaliplatino y carboplatino), procarbazona, hidroxiurea, mitotano y aminoglutetimida;
- hormonas, análogos de hormona (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida y nilutamida), e inhibidores de la aromatas (letrozol y anastrozol);
- anticoagulantes, tales como heparina, sales sintéticas de heparina y otros inhibidores de trombina;
- agentes fibrinolíticos, tales como activador tisular del plasminógeno, estreptocinasa, urocinasa, aspirina, dipiridamol, ticlopidina y clopidogrel;
- agentes antimigratorios;
- agentes antisecretores (breveldina);
- 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);
- bloqueantes de receptores de la angiotensina, donantes de óxido nítrico;
- oligonucleótidos antisentido;
- anticuerpos, tales como trastuzumab y rituximab;
- inhibidores del ciclo celular e inductores de la diferenciación, tales como tretinoína;
- inhibidores, inhibidores de la topoisomerasa (doxorubicina, daunorubicina, dactinomycin, enipósido, epirubicina, etopósido, idarubicina, irinotecán, mitoxantrona, topotecán e irinotecán) y corticosteroides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona y prednisolona);
- inhibidores de cinasas de la transducción de señales del factor de crecimiento;
- inductores de la disfunción;
- toxinas, tales como toxina del cólera, ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, toxina diftérica e inhibidores de la caspasa;
- y cromatina.

Composiciones

- La presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo, y un vehículo aceptable. En algunas realizaciones, la composición adicional incluye un segundo agente terapéutico.
- En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Además, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" será en general una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.
- El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que el terapéutico se administra. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear 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 sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH, tales como acetatos, citratos o fosfatos. Agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; quelantes, tales como ácido etilendiaminetetraacético; y también se conciben agentes para el ajuste de tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales, tales como calidades farmacéuticas 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. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de unión al antígeno, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo de manera que se proporcione la forma para la apropiada administración al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración. La

preparación parental se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

En una realización, la composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a los seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. En caso necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los componentes se suministran ya sea por separado o mezclados juntos en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Donde la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Donde la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los componentes se puedan mezclar antes de la administración.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos murinos

Este ejemplo describe el proceso de preparación de anticuerpos monoclonales de ratón anti-GM-CSF humano usando la tecnología de hibridomas. Se usó la proteína GM-CSF humana recombinante como antígeno. Para generar los anticuerpos monoclonales de ratón contra el GM-CSF humano, diferentes cepas de ratones de 6-8 semanas que incluyen ratones BALB/c, C57/BL6 o SJL se inmunizaron en primer lugar con 20 µg de GM-CSF humano recombinante. El día 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, se probaron por ELISA sueros de ratones inmunizados. Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación con proteína GM-CSF humana a 1 µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo a temperatura ambiente (TA) durante la noche, luego se bloquearon con 100 µl/pocillo de 5 % de BSA. Las diluciones de plasma de ratones inmunizados se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a TA. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a TA. Después de lavar, las placas se desarrollaron con el sustrato ABTS y se analizaron por espectrofotómetro a DO 405 nm. Los ratones con títulos suficientes de IgG anti-GM-CSF se reforzaron con 25 µg de proteína GM-CSF humana recombinante el día 60 después de la inmunización. Los ratones resultantes se usaron para las fusiones.

Se probaron sobrenadantes de hibridoma para IgG anti-GM-CSF por cribado por ELISA. Se seleccionaron los clones de hibridomas primarios positivos para ELISA para la subclonación usando un método de dilución limitada y se probaron además por el ensayo de unión de ELISA de confirmación (**FIG. 1**) y el ensayo de proliferación de TF-1 (**FIG. 2**). Antes de la estimulación de GM-CSF, las células TF-1 se lavaron con medio basal RPMI1640 y ayunaron durante la noche. El día 2, se recogieron estas células en ayunas y luego se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/ml en 50 µl por pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano.

GM-CSF recombinante humano (Genscript) a una concentración de 0,2 ng/ml (4X) se mezcló 1:1 de 20 % de sobrenadante de cultivo de hibridoma (4X) y se añadió 50 µl de la mezcla a las células TF-1, por lo que la concentración final para GM-CSF fue 0,05 ng/ml y para el sobrenadante de hibridoma fue 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 hibridomas. Se midió el 100 % de inhibición de la proliferación de TF-1 omitiendo GM-CSF del ensayo y manteniendo las células en medio completo RPMI1640 solo. Entonces se incubaron las células TF-1 durante 72 horas a 37 °C. Se midió la viabilidad celular por ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® según el protocolo del fabricante.

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

Ejemplo 2. Unión de los anticuerpos murinos a GM-CSF humano o de macaco de la India

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

Se recubrió GM-CSF humano recombinante o de macaco de la India (Genscript) a 1 µg/ml en PBS sobre placas de microtitulación durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Después del recubrimiento de antígeno, los pocillos se bloquearon con PBS/0,05 % de Tween (PBST) con 1 % de BSA durante 1 h a TA. Después de lavar los pocillos con

PBST, se añadió diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GM-CSF al pocillo y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Para la detección de los anticuerpos de unión, se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc de ratón (Jackson Immuno Research), seguido por la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pocillos 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 FIG. 3, tanto los anticuerpos 23F4 como 50C5 mostraron una unión dependiente de la dosis a GM-CSF humano con CE_{50} de 11,8 ng/ml y 14,6 ng/ml, respectivamente, y GM-CSF de macaco de la India con CE_{50} de 10,2 ng/ml y 21,7 ng/ml, respectivamente.

Ejemplo 3. Cinética de unión de los anticuerpos murinos con GM-CSF humano

La FIG. 4 representa la cinética de unión de 23F4 y 50C5 con GM-CSF humano recombinante. Se estableció GM-CSF humano recombinante como un analito con concentraciones en serie (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 nM). El ensayo cinético de unión del anticuerpo al antígeno se realizó usando el sistema Biacore T200 mediante un enfoque de captura de anticuerpo de ratón. Se inmovilizó la IgG anti-Fc de ratón sobre el chip sensor CM5 según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de prueba se inyectó y se capturó por la IgG anti-Fc de ratón inmovilizada. Y luego se inyectaron individualmente concentraciones en serie del antígeno, y se registró el perfil de unión para cada concentración de analito antigénico, respectivamente. El sistema de ensayo se regeneró por inyección de glicina-HCl 10 mM a pH 1,5 durante 30 segundos. El tampón de electroforesis fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,05 % de P20). La temperatura del ensayo fue 25 °C, y los tiempos de asociación y disociación fueron 180 y 600 segundos, respectivamente.

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 de disociación (k_d), así como la constante de equilibrio (KD). Además de la FIG. 4, algunos datos resumen se presentan en la tabla a continuación.

Muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (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

Para probar la potencia de los anticuerpos en el bloqueo de la unión de GM-CSF a la cadena alfa del receptor de GM-CSF, se recubrió la proteína alfa del receptor de GM-CSF humano recombinante (CD116) a 2 µg/ml en PBS sobre placas de microtitulación durante la noche a 4 °C. Después del recubrimiento del antígeno, los pocillos se bloquearon con PBS/0,05 % de Tween (PBST) con 1 % de BSA durante 1 h a 4 °C. Después de lavar los pocillos con PBST, se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GM-CSF al pocillo en presencia de proteína GM-CSF humana biotinilada (0,05 µg/ml) y se incubó durante 1 h a 4 °C.

Para la detección de la unión de GM-CSF biotinilado al receptor recubierto, se añadió la estreptavidina conjugada con HRP, seguido por la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pocillos de la placa se lavaron con PBST tres veces. Se midió la fluorescencia en un lector de placas TECAN Spectrafluor. Como se muestra en la FIG. 5, ambos anticuerpos mostraron una inhibición dependiente de la dosis de la unión de GM-CSF al receptor alfa de GM-CSF.

Ejemplo 5. El bloqueo de GM-CSF por los anticuerpos murinos indujo la señalización de pSTAT5

Se purificaron monocitos CD14+ de sangre periférica humana usando microperlas CD14 positivas (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 anticuerpo 23F4. Después de la incubación, las células se recogieron y se lavaron con tampón FACS (1x PBS+ 2 % de FBS) y se permeabilizaron por 2 % de PFA, seguido por la fijación celular usando metanol helado. Entonces se añadió el anticuerpo anti-pSTAT5 conjugado con PE a las células durante otra incubación de 30 minutos a 4 °C y se analizó por citometría de flujo. El % de inhibición se calculó por $[1 - (MFI \text{ de muestra de prueba} / MFI \text{ de control})] \times 100 \%$. La adición de los anticuerpos podría disminuir significativamente el nivel de activación de pSTAT5 inducida por GM-CSF en dosis de 0,1 o 1 µg/ml (FIG. 6).

Ejemplo 6. Inhibición de la proliferación de TF-1 dependiente de GM-CSF por los anticuerpos murinos

Antes de la estimulación de GM-CSF, las células TF-1 se lavaron con medio basal RPMI1640 y ayunaron durante la noche. El día 2, se recogieron estas células en ayunas y luego se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/ml en 50 µl por pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano. Se mezcló GM-CSF recombinante humano (Genscript) a una concentración de 0,2 ng/ml (4X) 1:1 con anticuerpos murinos anti-GM-CSF (0,01 ng/ml - 1000 ng/ml diluido en medio completo) y se añadieron 50 µl de la mezcla a las células TF-1. Se midió la proliferación celular máxima (0 % de inhibición) incubando las células TF-1 a una concentración final de GM-CSF de 0,05 ng/ml, sin la adición de anticuerpo. Se midió el 100 % de inhibición de la proliferación de TF-1

omitiendo el GM-CSF del ensayo y manteniendo las células en medio completo RPMI1640 solo. Se incubaron entonces las células TF-1 durante 72 horas a 37 °C. Se midió la viabilidad celular por el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® según el protocolo del fabricante. El valor de CI_{50} para 23F4 y 50C5 en la inhibición de la proliferación de TF-1 fue para ambos aproximadamente 10,9 ng/ml (**FIG. 7**).

Ejemplo 7. Humanización de los anticuerpos murinos

Se emplearon genes de la región variable de anticuerpos murinos para crear mAb humanizado. En la primera etapa de este proceso, las secuencias de aminoácidos de VH y VK de los anticuerpos se compararon con la base de datos disponible de secuencias de genes de Ig humana para encontrar las secuencias del gen de Ig de la línea germinal humana del mejor apareamiento.

Entonces se diseñaron secuencias del dominio variable humanizadas donde CDR1, 2 y 3 de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se injertaron en secuencias de la región estructural de los genes de Ig humana. Entonces se generó un modelo 3D para determinar si hubo algunas posiciones de la región estructural donde la sustitución del aminoácido de ratón por el aminoácido humano (retromutaciones) podría afectar la unión y/o conformación de CDR. Las secuencias relevantes y retromutaciones se muestran en las tablas a continuación.

Secuencias de CDR de 23F4 VH

CDR1	SHILH (SEQ ID NO. 1)
CDR2	WIFPGDDKTKYNEKFKG (SEQ ID NO. 2)
CDR3	GTKILNWNFDV (SEQ ID NO. 3)

Secuencias de CDR de 23F4 VL

CDR1	KANQNVGTTLA (SEQ ID NO. 4)
CDR2	SASYRYS (SEQ ID NO. 5)
CDR3	HQYTTYPLT (SEQ ID NO. 6)

Diseño de humanización para 23F4

Diseño de VH I: VH1-f/JH6	
Construcción	Mutación
23F4 VH	Quimera
23F4 VH.1	Injertada en CDR, 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 de VH II: VH1-f/JH6	
23F4 VH.2	Injertada en CDR, 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 de VK: L8/Jk4	
Construcción	Mutación
23F4Vk	Quimera
23F4 Vk.1	Injertada en CDR
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

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

Secuencias de anticuerpos humanizados (los restos de CDR están subrayados y las retromutaciones están en los recuadros indicados)

23F4 VH	QVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKTSDYTLTSHYLNHWVKQRPQGGLWIGW IFPGDDKTKYNEKFKGKATLTSDKTSNTAYMQLSSLTSEESAVYFCARGT KYLNNWFDVWGTGTTVTVSS	SEQ ID NO. 7
23F4 VH.1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTTSHYLNHWVQQAAPGKGLWIMGW IFPGDDKTKYNEKFKGRVTITADTSTDYAMELSSLRSEDYVYYCARGT KYLNNWFDVWGGQTTVTVSS	SEQ ID NO. 8

(continuación)

23F4 VH.1a	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGKGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLTSDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 9
23F4 VH.1b	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGKGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLTSDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 10
23F4 VH.1c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGKGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLTSDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 11
23F4 VH.1d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGKGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLTSDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 12
23F4 VH.2	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> VTMTSDTSISTAYMELSLRSDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 13
23F4 VH.2a	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> VTMTSDTSISTAYMELSLRSDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 14
23F4 VH.2b	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> VTMTSDTSISTAYMELSLRSDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 15
23F4 VH.2c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLTSDTSISTAYMELSLRSDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 16
23F4 VH.2d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVRQAPGQGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> ATLTSDTSISTAYMELSLRSDYAVYYCARGT <u>KYLNWNFDVWGQGT</u> TVTVSS	SEQ ID NO. 17
23F4Vk	DIQLTQSPKFLSTSVGDRVSVTCKANQNVGTTLAWYQQKPGQSPKALIYS ASYRYS GVPDRFTGSGSGTDEFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>HOYTTYPLT</u> FGG GTKLEIK	SEQ ID NO. 18
23F4 Vk.1	DIQLTQSPSFLSASVSGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKLLIYS ASYRYS GVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCH <u>HOYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO. 19
23F4 Vk.1a	DIQLTQSPSFLSASVSGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKALIYS ASYRYS GVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCH <u>HOYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO. 20
23F4 Vk.1b	DIQLTQSPSFLSASVSGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKALIYS ASYRYS GVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCH <u>HOYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO. 21
23F4 Vk.1c	DIQLTQSPSFLSASVSGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKSPKALIYS ASYRYS GVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYFC <u>HOYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO. 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					Quimera 23F4

Secuencias de CDR de 50C5 VH

CDR1	PYSIH (SEQ ID NO. 23)
CDR2	YINPSTGYIEYNQHFKD (SEQ ID NO. 24)
CDR3	GGCOLORANTEGYFDY (SEQ ID NO. 25)

Secuencias de CDR de 50C5 VL

CDR1	RLNENIYSFLA (SEQ ID NO. 26)
CDR2	NAETLAE (SEQ ID NO. 27)
CDR3	QQHYGTPYT (SEQ ID NO. 28)

Diseño de humanización para 50C5

Diseño de VH I: VH1-69/JH6	
Construcción	Mutación
50C5 VH	Quimera
50C5 VH.1	Injertada en CDR, 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 de VK: O12/Jk4	
Construcción	Mutación
50C5Vk	Quimera
50C5 Vk.1	Injertada en CDR
50C5 Vk.1a	Basada en 50C5 Vk.1, 148V
50C5 Vk.1b	Basada en 50C5 Vk.1, 148V, G57D
50C5 Vk.1c	Basada en 50C5 Vk.1, 148V, G57D, D70Q
50C5 Vk.1d	Basada en 50C5 Vk.1, 148V, G57D, D70Q, A43S

Secuencias de anticuerpo humanizado (los restos de CDR están subrayados y las retromutaciones están en los recuadros indicado)

50C5 VH	QVQLQQSAAELVRFGASVKMSCKASGYIFTPYSIH ^W IKQRPQGGLWIGY INPSTGYIEYNQHFKD ^{RT} TLTADKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYYCARGG DYEGYFDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO. 29
50C5VH.1	^E VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSPYSIH ^W VRQAPGQGLEWMGY INPSTGYIEYNQHFKD ^{RV} ITADKSTSTAYMEL ^R SLRSEDTAVYYCARGG DYEGYFDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO. 30
50C5 VH.1a	^E VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSPYSIH ^W VRQAPGQGLEWMGY INPSTGYIEYNQHFKD ^{RV} ITADKSTSTAYMEL ^R SLRSEDTAVYYCARGG DYEGYFDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO. 31
50C5 VH.1b	^E VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFSPYSIH ^W VRQAPGQGLEWMGY INPSTGYIEYNQHFKD ^{RV} ITADKSTSTAYMEL ^R SLRSEDTAVYYCARGG DYEGYFDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO. 32
50C5 VH.1c	^E VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFSPYSIH ^W VRQAPGQGLEW ^I GY INPSTGYIEYNQHFKD ^{RV} ITADKSTSTAYMEL ^R SLRSEDTAVYYCARGG DYEGYFDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO. 33
50C5 VH.1d	^E VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFSPYSIH ^W VRQAPGQGLEW ^I GY INPSTGYIEYNQHFKD ^{RT} TLTADKSTSTAYMEL ^R SLRSEDTAVYYCARGG DYEGYFDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO. 34
50C5 VH.1e	^E VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTPYSIH ^W VRQAPGQGLEW ^I GY INPSTGYIEYNQHFKD ^{RT} TLTADKSTSTAYMEL ^R SLRSEDTAVYYCARGG DYEGYFDYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO. 35
50C5 Vk	DIQMTQSPDLSASVGETVTIT ^C RLNENIYSFLAWYQQKQKSPQLLVYNA ETLAE ^D VPSRFGSGSGTQFSLKISSLTDDFGTY ^C QQHYGTPYTFGGGT NLEIE	SEQ ID NO. 36
50C5 Vk.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTIT ^C RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA ETLAE ^G VPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATY ^C QQHYGTPYTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO. 37
50C5 Vk.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTIT ^C RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA ETLAE ^G VPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATY ^C QQHYGTPYTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO. 38

(continuación)

50C5 Vk.1b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLVYNA ETLAEDVPSRFGSGSGCTDFTLTISLQPEDFATYYCQOHYGTPTFFGGT KVEIK	SEQ ID NO. 39
50C5 Vk.1c	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLVYNA ETLAEDVPSRFGSGSGCTQFTLTISLQPEDFATYYCQOHYGTPTFFGGT KVEIK	SEQ ID NO. 40
50C5 Vk.1d	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRLNENIYSFLAWYQQKPGKSPKLLVYNA ETLAEDVPSRFGSGSGCTQFTLTISLQPEDFATYYCQOHYGTPTFFGGT KVEIK	SEQ ID NO. 41

Combinación de VH/VK para el anticuerpo de humanización 50C5

Vk \ VH	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						Quimera 50C5

5 Ejemplo 8. Unión de anticuerpos humanizados a GM-CSF humano

Se probaron las variantes humanizadas para la unión a GM-CSF humano recombinante como se describe previamente. Se recubrió la proteína GM-CSF humana recombinante (Genscript) a 1 ug/ml en PBS sobre placas de microtitulación durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Después del recubrimiento del antígeno, los pocillos se bloquearon con PBS/0,05 % de Tween (PBST) con 1 % de BSA durante 1 h a TA. Después de lavar los pocillos con PBST, se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GM-CSF humanizados al pocillo y se incubaron durante 1 a TA.

Para la detección de los anticuerpos de unión, se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc de ratón (Jackson Immuno Research), seguido por la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pocillos 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 **FIG. 8**, todas las variantes humanizadas mostraron una potencia de unión similar contra GM-CSF humano en comparación con el anticuerpo quimérico.

20 Ejemplo 9. Cinética de unión de anticuerpos humanizados

Se midió la cinética de unión de anticuerpos humanizados por Biacore como se describe previamente. Se estableció GM-CSF humano recombinante como un analito con concentraciones en serie (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 nM). El ensayo cinético de unión del anticuerpo al antígeno se realizó usando el sistema Biacore T200 mediante un enfoque de captura de anticuerpo de ratón. Se inmovilizó la IgG anti-Fc humana sobre el chip sensor CM5 según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de prueba se inyectó y se capturó por la IgG anti-Fc humana inmovilizada. Y luego se inyectaron individualmente concentraciones en serie del antígeno, y se registró el perfil de unión para cada concentración de analito antigénico, respectivamente.

El sistema de ensayo se regeneró por inyección de glicina-HCl 10 mM a pH 1,5 durante 30 segundos. El tampón de electroforesis fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y 0,05 % de P20). La temperatura del ensayo fue 25 °C, y los tiempos de asociación y disociación fueron 180 y 600 segundos, respectivamente. 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 de disociación (k_d), así como la constante de equilibrio (K_D). Como se muestra en las tablas a continuación, a partir de 23F4, Hu23F4-13, Hu23F4-27 y Hu23F4-36 se mostró una afinidad de unión más fuerte en comparación con el anticuerpo quimérico; a partir de 50C5, Hu50C5-8, Hu50C5-17, Hu50C5-18, Hu50C5-19, Hu50C5-21 y Hu50C5-23 se mostró una afinidad de unión más fuerte en comparación con el anticuerpo quimérico.

Antígeno	Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
GM-CSF	3523-Hu23F4-5	1,188E+6	1,239E-4	1,043E-10
	3523-Hu23F4-6	8,76SE+S	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-Hu23F4-23	8,994E+5	1,164E-4	1,295E-10
	3523-Hu23F4-25	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+S	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	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (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

Antes de la estimulación de GM-CSF, se lavaron células TF-1 con medio basal RPMI1640 y ayunaron durante la noche. El día 2, se recogieron estas células en ayunas y luego se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/ml en 50 μ l por pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano. GM-CSF recombinante humano (Genscript) 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 diluido en medio completo) y se añadió 50 μ l de la mezcla a las células TF-1. Se midió la proliferación celular máxima (0 % de inhibición) incubando células TF-1 a una concentración final de GM-CSF de 0,05 ng/ml, sin la adición de anticuerpo. Se midió el 100 % de inhibición de la proliferación de TF-1 omitiendo GM-CSF del ensayo y manteniendo las células en medio completo RPMI1640 solo. Entonces se incubaron las células TF-1 durante 72 horas a 37 °C. Se midió la viabilidad celular por ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® según 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 CI_{50} de 4,95 ng/ml, 3,95 ng/ml y 3,30 ng/ml, respectivamente (**FIG. 9**). Entre los anticuerpos humanizados de 50C5 probados, Hu50C5-23 mostró la inhibición más fuerte con una CI_{50} de 14,31 ng/ml (**FIG. 9**).

Nombre de anticuerpo	CI_{50} para la proliferación de TF-1
Quimera hu23F4	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
Quimera hu50C5	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

Se purificaron monocitos CD14+ de sangre humana periférica usando microperlas CD14 positivas (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 % de FBS) y se permeabilizaron por 2 % de PFA, seguido por unión a células usando metanol helado. Entonces se añadió el anticuerpo anti-pSTAT5 conjugado con PE a las células durante otra incubación de 30 minutos a 4 °C y se analizó por citometría de flujo. El % de inhibición se calculó por $[1 - (\text{MFI de muestra de prueba} / \text{MFI de control})] \times 100 \%$. La adición de Hu23F4-13, Hu23F4-27, Hu23F4-36, Hu50C5-17 y Hu50C5-23 pudo disminuir significativamente el nivel de activación de pSTAT5 inducida por GM-CSF en dosis de 0,1 o 1 µg/ml (**FIG. 10**).

Ejemplo 12. Unión de anticuerpos humanizados a GM-CSF de macaco de la India

Se recubrió proteína GM-CSF recombinante de macaco de la India (Genscript) a 1 µg/ml en PBS sobre placas de microtitulación durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Después del recubrimiento del antígeno, los pocillos se bloquearon con PBS/0,05 % de Tween (PBST) con 1 % de BSA durante 1 h a TA. Después de lavar los pocillos con PBST, se añadió diferentes concentraciones de anticuerpos anti-GM-CSF humanizados al pocillo y se incubó durante 1 h a TA. Para la detección de los anticuerpos de unión, se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con HRP contra Fc de ratón (Jackson Immuno Research), seguido por la adición de sustratos fluorogénicos (Roche). Entre todas las etapas de incubación, los pocillos 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 **FIG. 11**, Hu23F4-13, Hu23F4-27 y Hu23F4-36 mostraron una unión dependiente de la dosis a GM-CSF de macaco de la India con una CE_{50} 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 a GM-CSF de macaco de la India con una CE_{50} de 18,86 ng/ml y 21,63 ng/ml, respectivamente.

Nombre de anticuerpo	CE_{50} para la unión de GM-CSF de macaco de la India
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 macaco cangrejero

De los resultados previos de ensayos de bioactividad *in vitro*, se seleccionó Hu23F4-27 para determinar las propiedades farmacocinéticas en macaco cangrejero intacto. Se administró anticuerpo Hu23F4-27 por inyección intravenosa en embolada a macaco cangrejero intacto en diferentes dosis de 0,4 mg/kg, 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. Las muestras de plasma se recogieron en momentos de tiempo seleccionados hasta 28 días después de la administración, y la concentración de la proteína respectiva se determinó por ELISA. Entonces se calcularon los parámetros farmacocinéticos usando un enfoque no compartimental con WinNonlin (Certara, CA) y se muestra en **FIG. 12**.

Grupo (n=2)	$T_{1/2}$ (h)	$C_{\text{máx}}$ (µg/ml)	ABC_{0-t} (día*µg/ml)	ABC_{inf} (día*µg/ml)	CL (ml/h/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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> 1-MAB

<120> ANTICUERPOS ANTI-GM-CSF Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 54LW-258793-WO

<150> CN201610831525.9

<151> 19-09-2016

<150> CN201610832677.0

<151> 19-09-2016

<160> 46

<170> Patentin versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5 <400> 1

 Ser His Tyr Leu His
 1 5

 <210> 2
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> Sintético

 <400> 2

 Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly
 20
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 3
 30
 Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val
 1 5 10

 <210> 4
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético
 40
 <400> 4

 Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr Leu Ala
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 50 <223> Sintético

 <400> 5

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

5
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Sintético
<400> 6

His Gln Tyr Thr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

15
<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Sintético
<400> 7

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Asp Tyr Thr Leu Thr Ser His
20 25 30

25
Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Thr Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

30
<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 887 343 T3

<223> Sintético

<400> 8

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

5

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15

<400> 9

ES 2 887 343 T3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 10

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 11

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

ES 2 887 343 T3

<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 12

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Asp Tyr Thr Leu Thr Ser His
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

20 <400> 13

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

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 14

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

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15

ES 2 887 343 T3

<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 15

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

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

20 <400> 16

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

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 17

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

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 107

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 18

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

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
20 25 30

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

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

ES 2 887 343 T3

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

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

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

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 21

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

ES 2 887 343 T3

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

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 23

Pro Tyr Ser Ile His
1 5

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 24

Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 887 343 T3

<223> Sintético

<400> 25

5 Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

15 <400> 26

Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Sintético

<400> 27

Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu
1 5

30 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 28

40 Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 29
<211> 119
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

50 <400> 29

ES 2 887 343 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 30

ES 2 887 343 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Pro Tyr

ES 2 887 343 T3

[illegible]

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 32

ES 2 887 343 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Pro Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 33
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 33

ES 2 887 343 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Pro Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 34

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Pro Tyr

ES 2 887 343 T3

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

<210> 35
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 35

ES 2 887 343 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 36

ES 2 887 343 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Asp Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 37

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

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

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

ES 2 887 343 T3

35

40

45

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

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

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

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

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintético

15

<400> 40

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr

ES 2 887 343 T3

85

90

95

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

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 42

Asp Tyr Thr Leu Thr
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 887 343 T3

	<223> Sintético	
	<400> 43	
5		Gly Tyr Thr Phe Thr 1 5
	<210> 44	
	<211> 5	
	<212> PRT	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
15	<400> 44	
		Gly Tyr Ile Phe Thr 1 5
	<210> 45	
20	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Sintético	
	<400> 45	
		Gly Tyr Ile Phe Ser 1 5
30	<210> 46	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sintético	
	<400> 46	
40		Gly Gly Thr Phe Ser 1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, que tiene especificidad por una proteína GM-CSF humana, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 14, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo biespecífico o fragmento variable monocatenario.
3. Uno o más polinucleótidos que codifican las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 o 2.
- 15 4. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Un anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 o 2 o la composición de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria en un paciente en necesidad del mismo, en donde la enfermedad o afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en 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 eritematoso sistémico (LES), nefritis, enfermedad de Parkinson (EP), vasculitis y colitis ulcerosa, y en donde la enfermedad o afección autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en *alopecia areata*, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, dermatomiositis, diabetes (tipo 1), celiacía, artritis idiopática juvenil autoinmunitaria, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia grave, miocarditis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, pénfigo/penfigoide, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia/esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, uveítis autoinmunitaria, vitiligo y granulomatosis con poliangitis (Wegener).
- 30 6. Un anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente en necesidad del mismo.
- 35 7. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición para su uso de la reivindicación 6, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de tiroides.
- 40 8. Un anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 o 2 o la composición de la reivindicación 4 para su uso en reducir o aliviar el dolor en un paciente en necesidad del mismo.

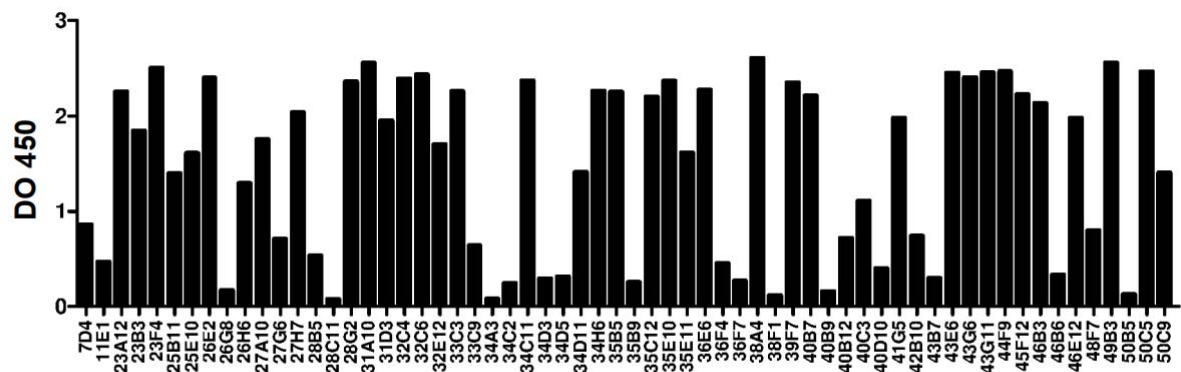


FIG. 1

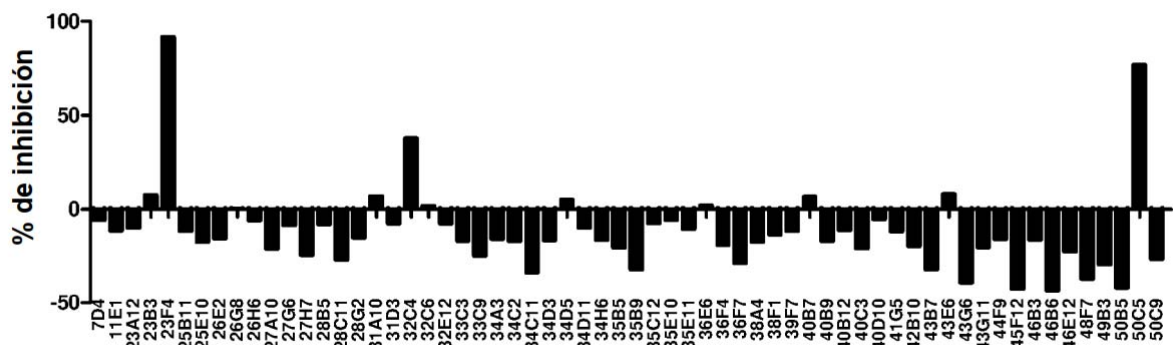


FIG. 2

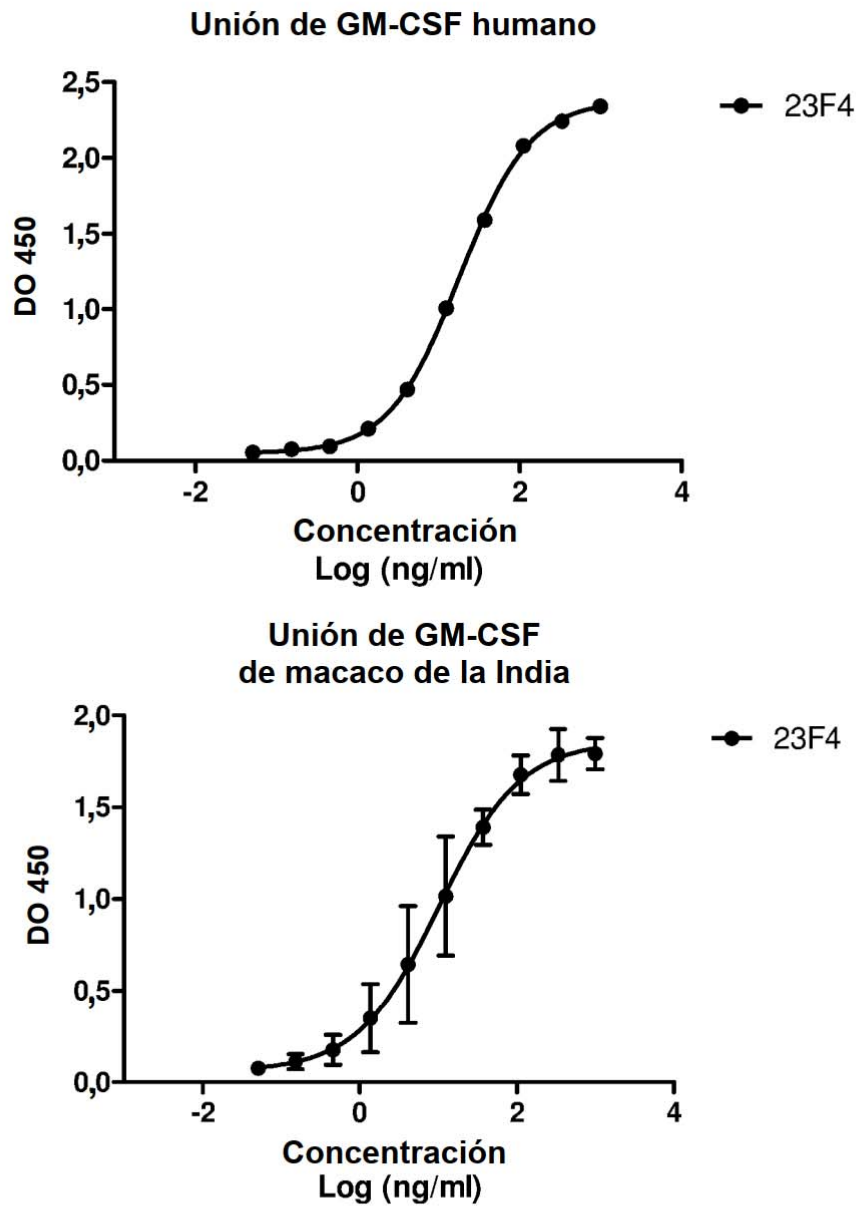


FIG. 3

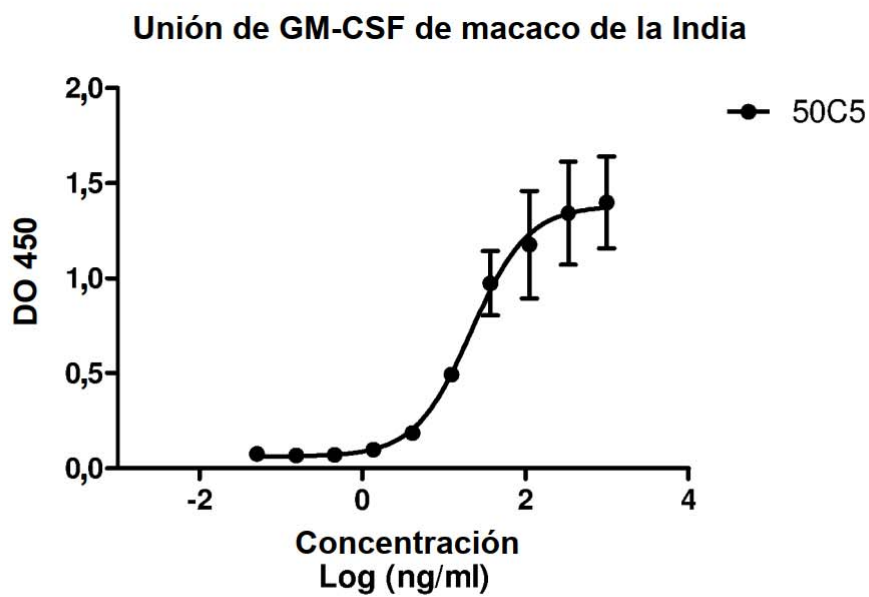
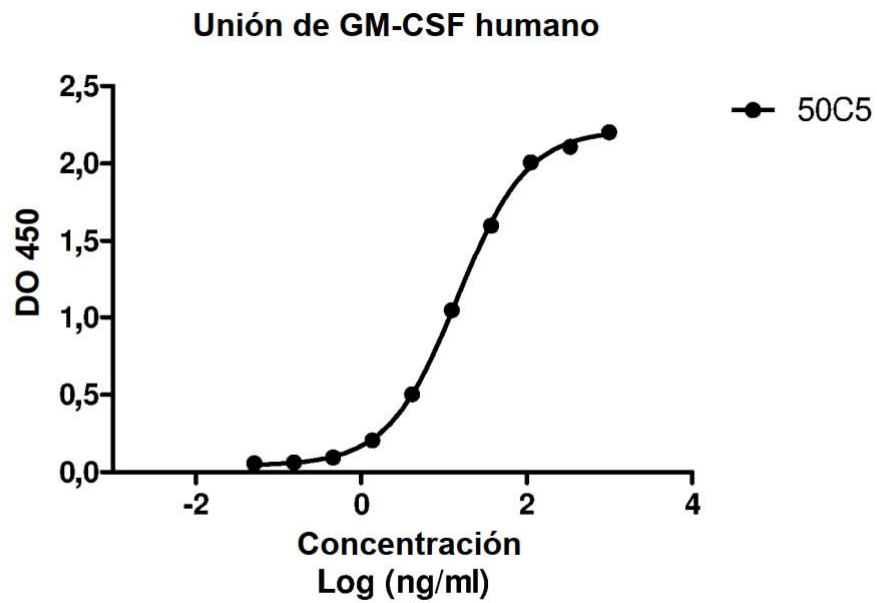


FIG. 3 (continuación)

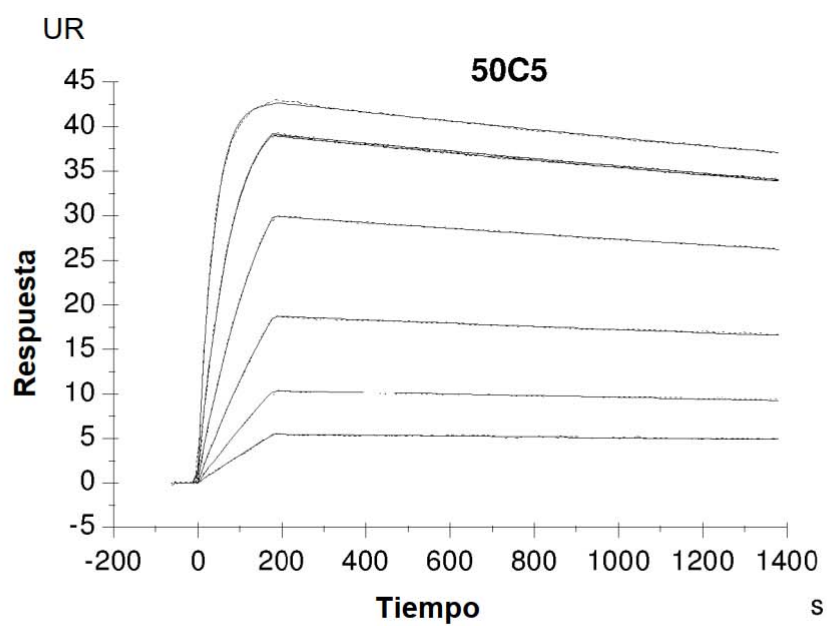
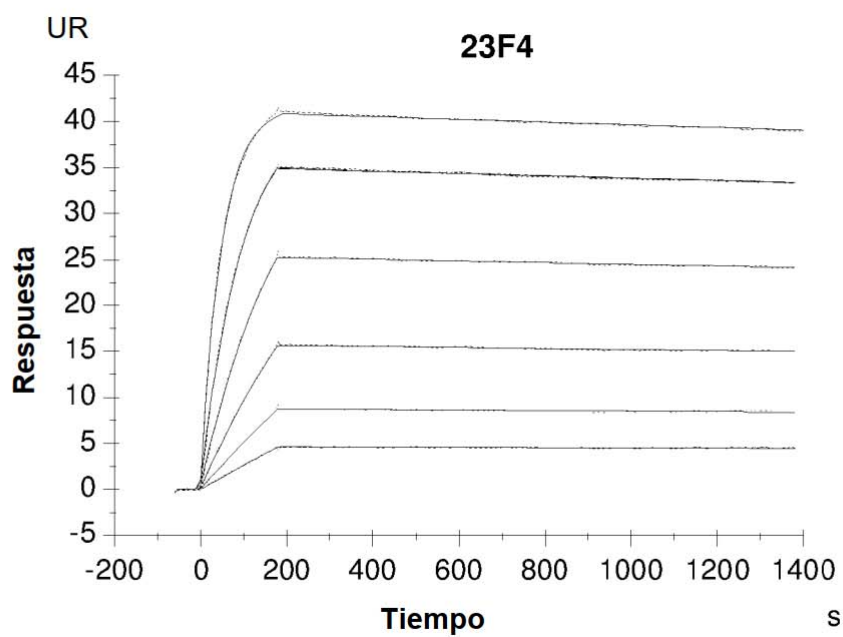


FIG. 4

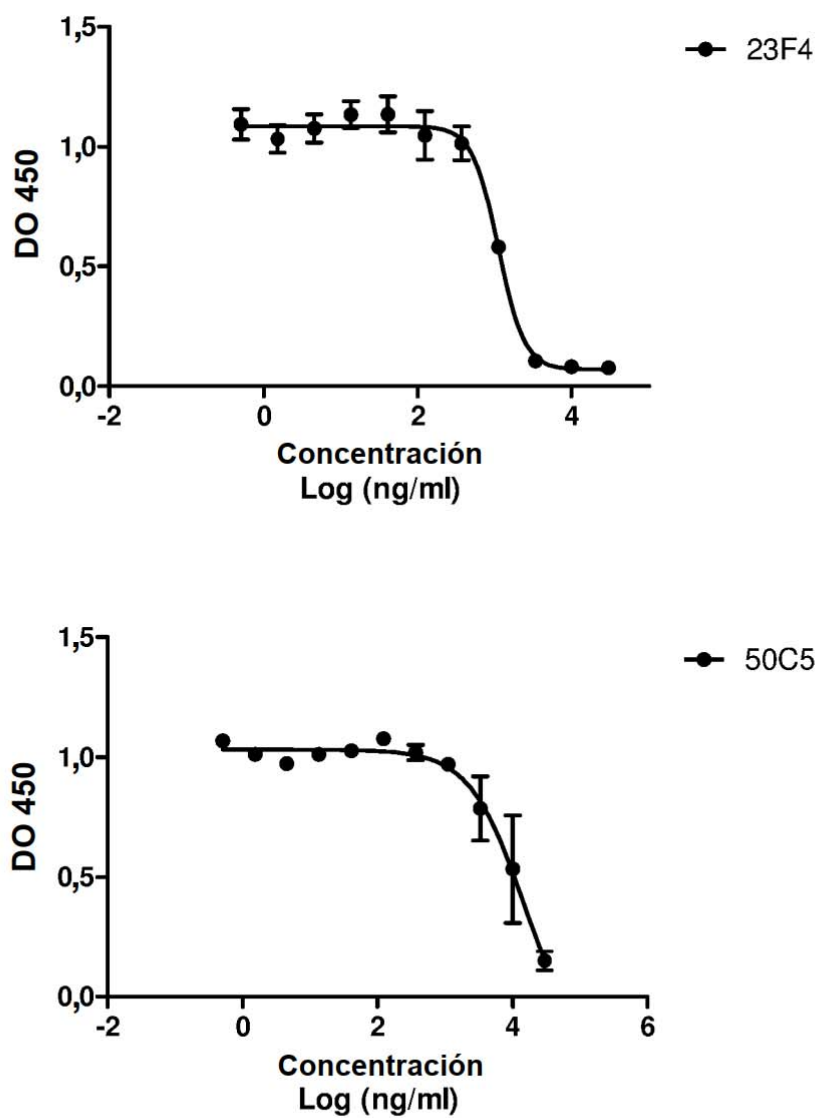


FIG. 5

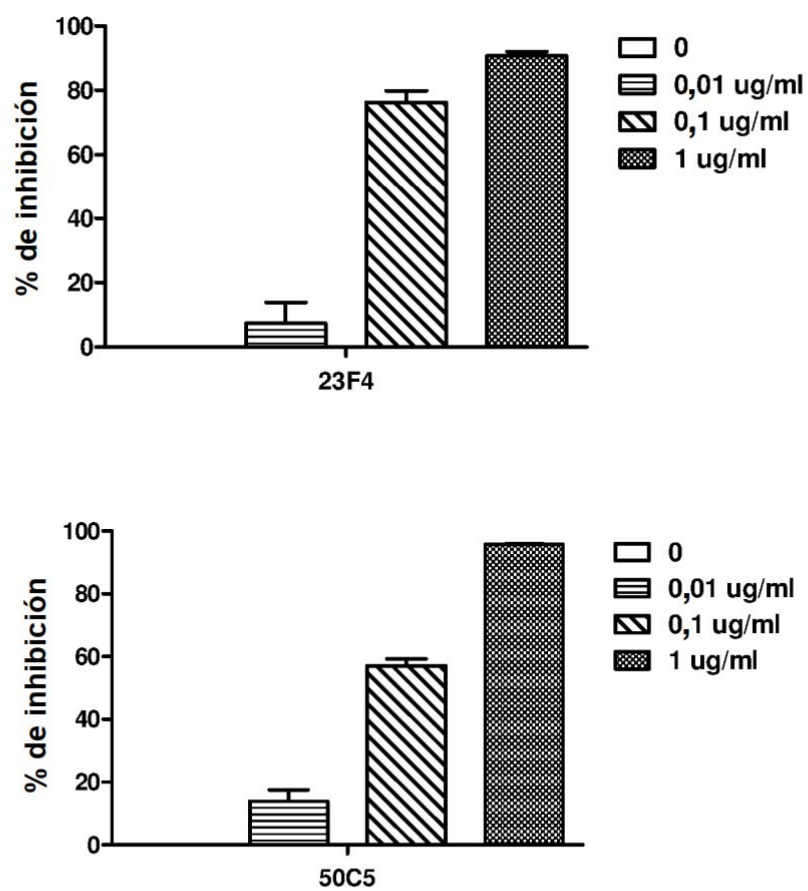


FIG. 6

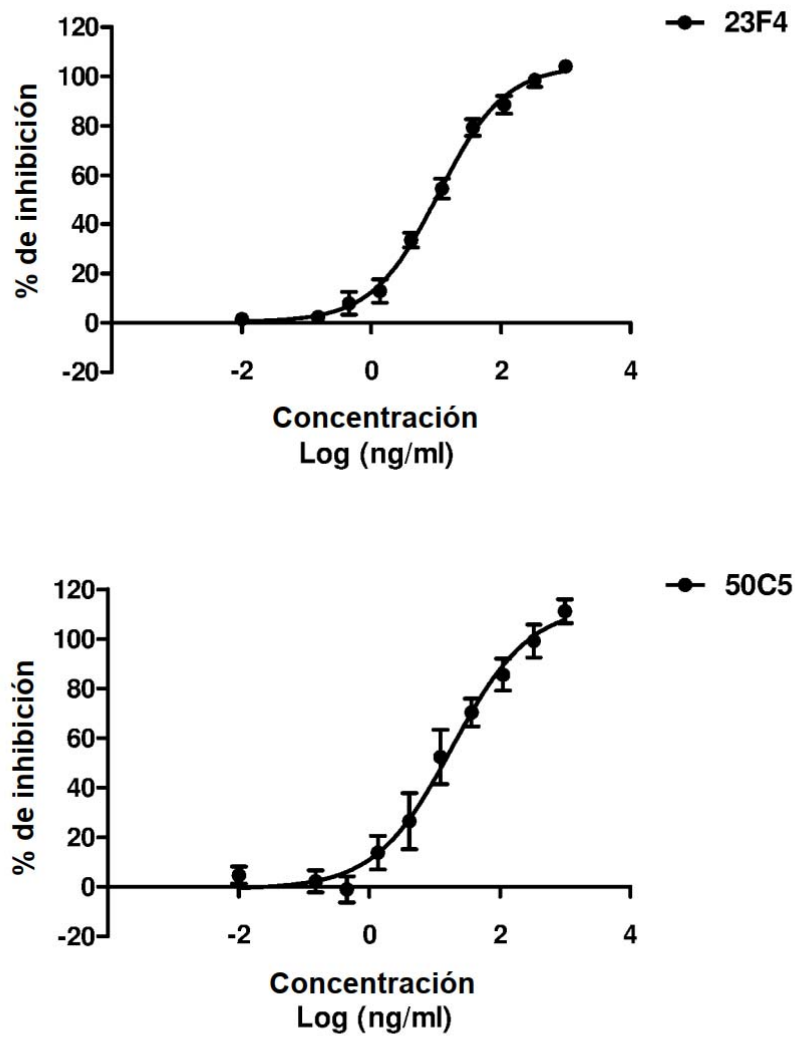
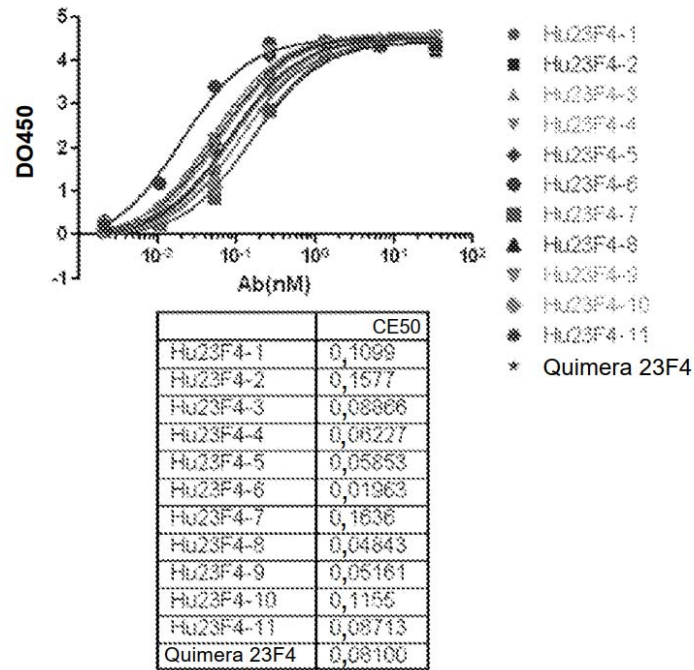


FIG. 7

ELISA de unión de Ab humanizados 23F4
hzgu 2016-05-18



ELISA de unión de Ab humanizados 23F4
hzgu 2016-05-18

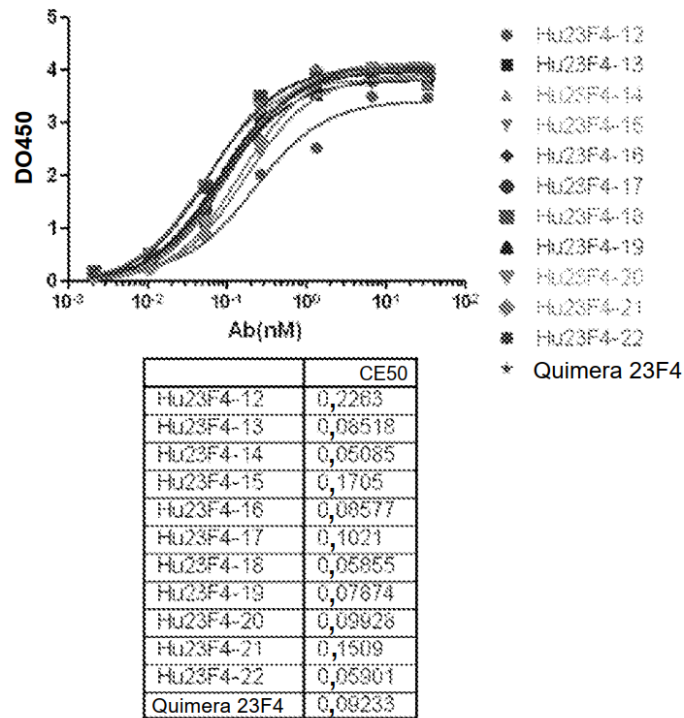
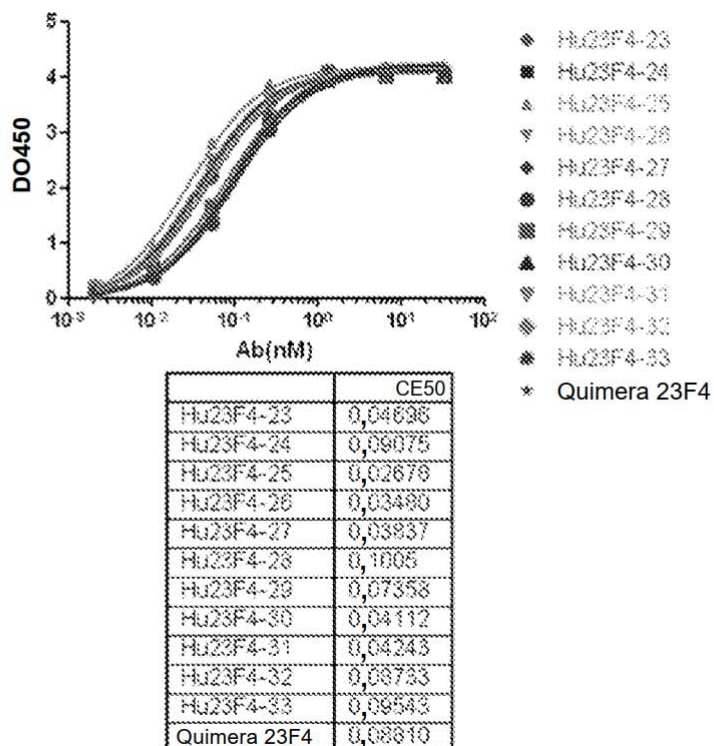


FIG. 8

ELISA de unión de Ab humanizados 23F4

hzgu 2016-05-18



ELISA de unión de Ab humanizados 23F4

hzgu 2016-05-18

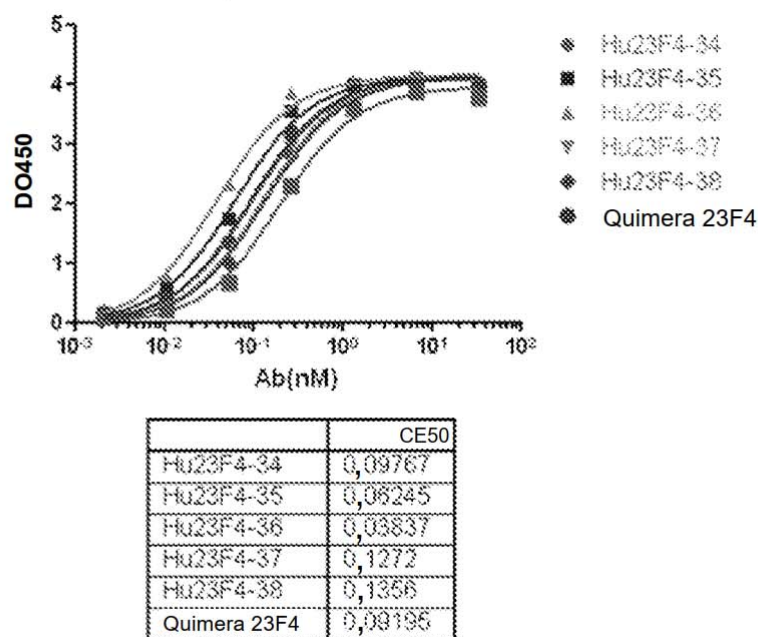
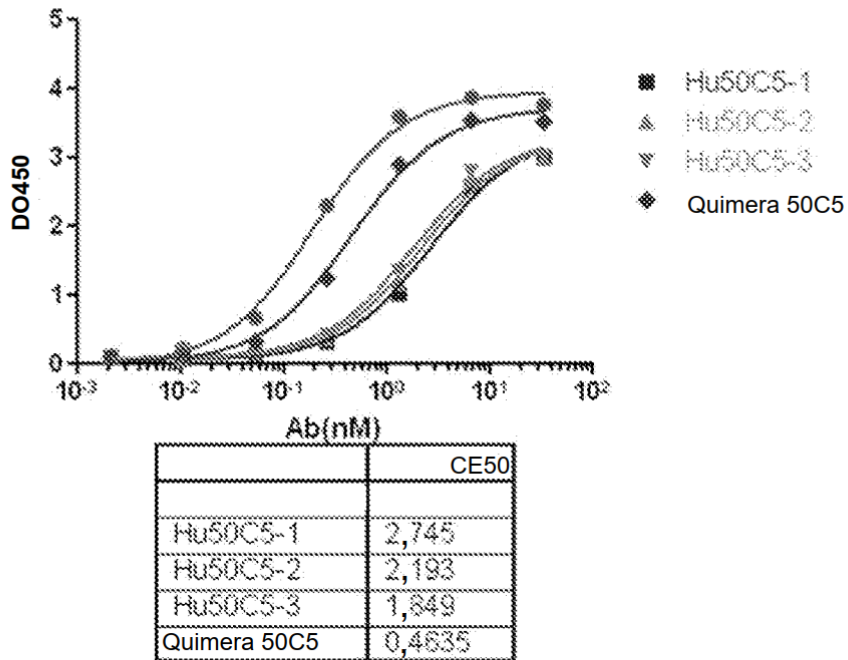


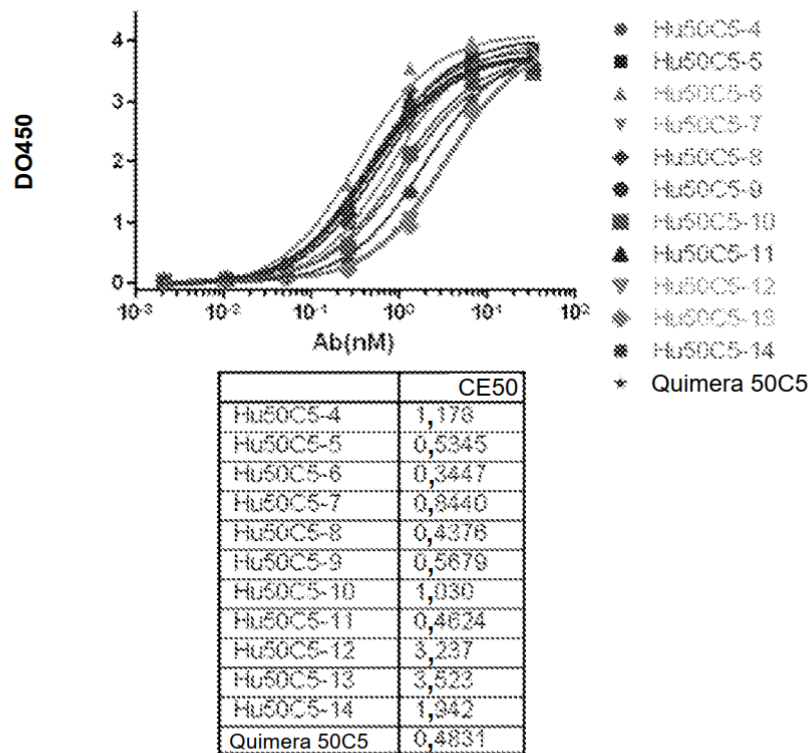
FIG. 8 (continuación)

ELISA de unión de Ab humanizados 50C5

hzgu 2016-05-18

**ELISA de unión de Ab humanizados 50C5**

hzgu 2016-05-18

**FIG. 8 (continuación)**

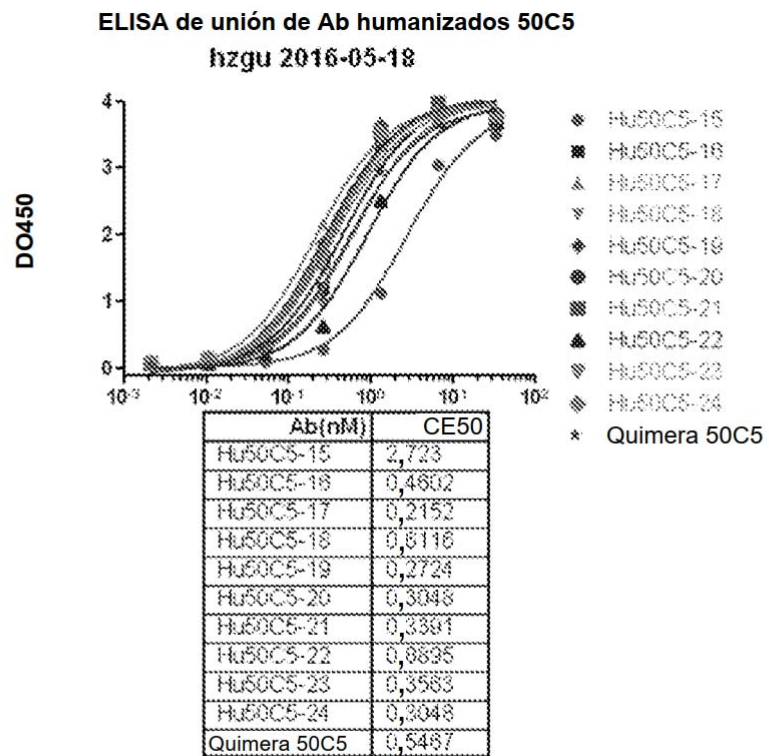


FIG. 8 (continuación)

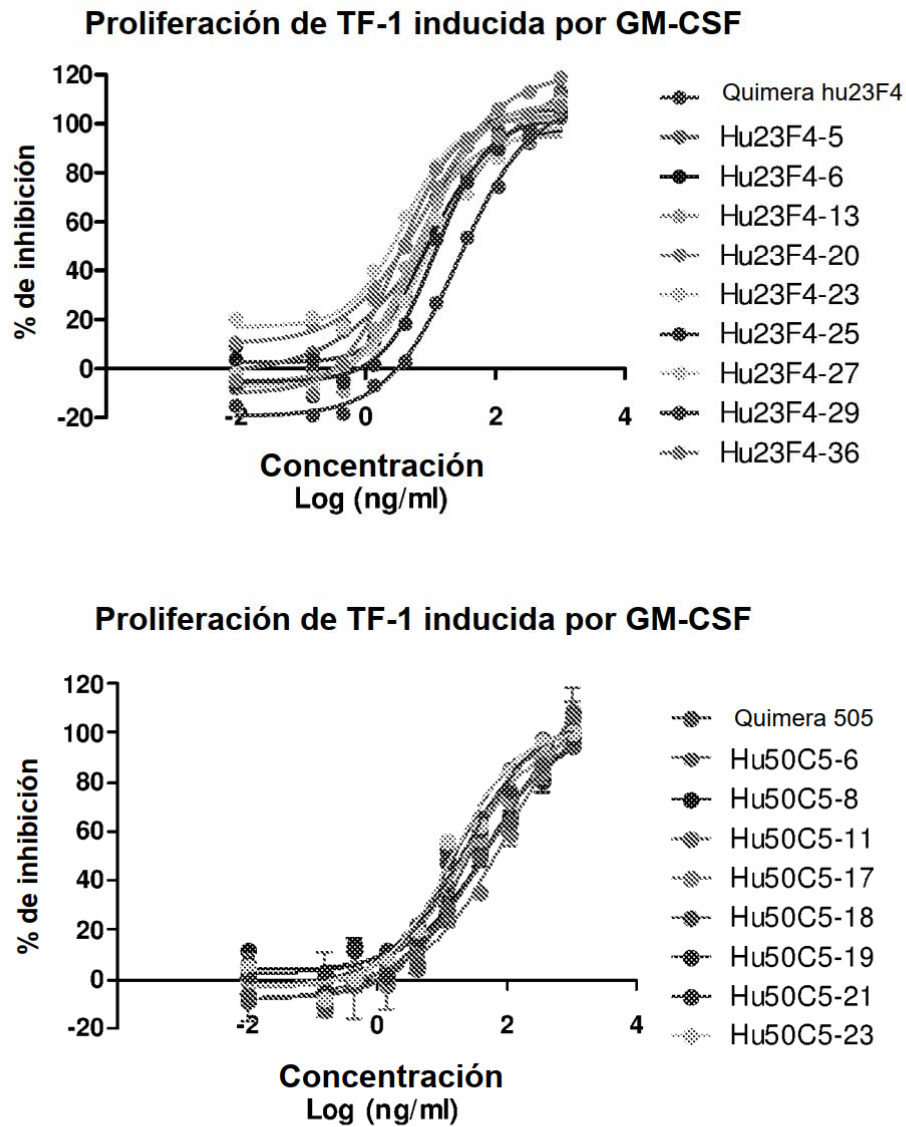


FIG. 9

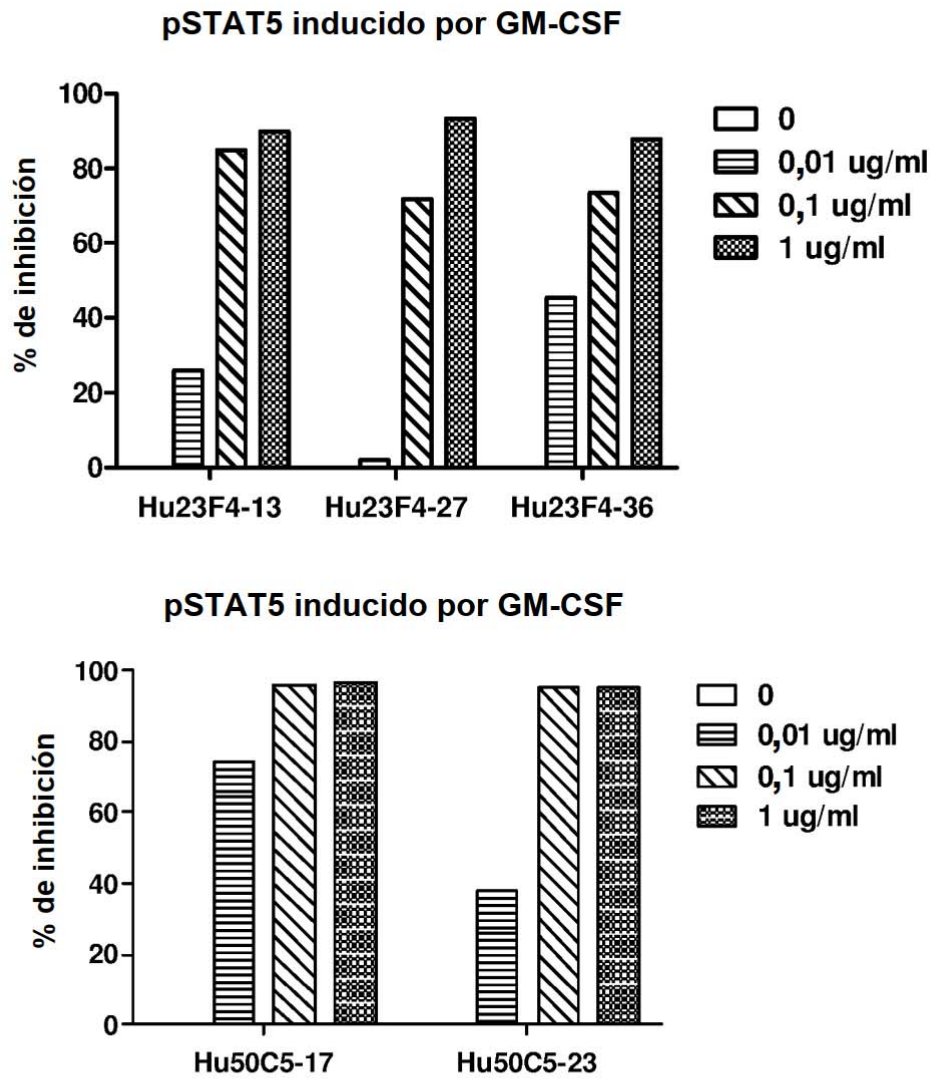


FIG. 10

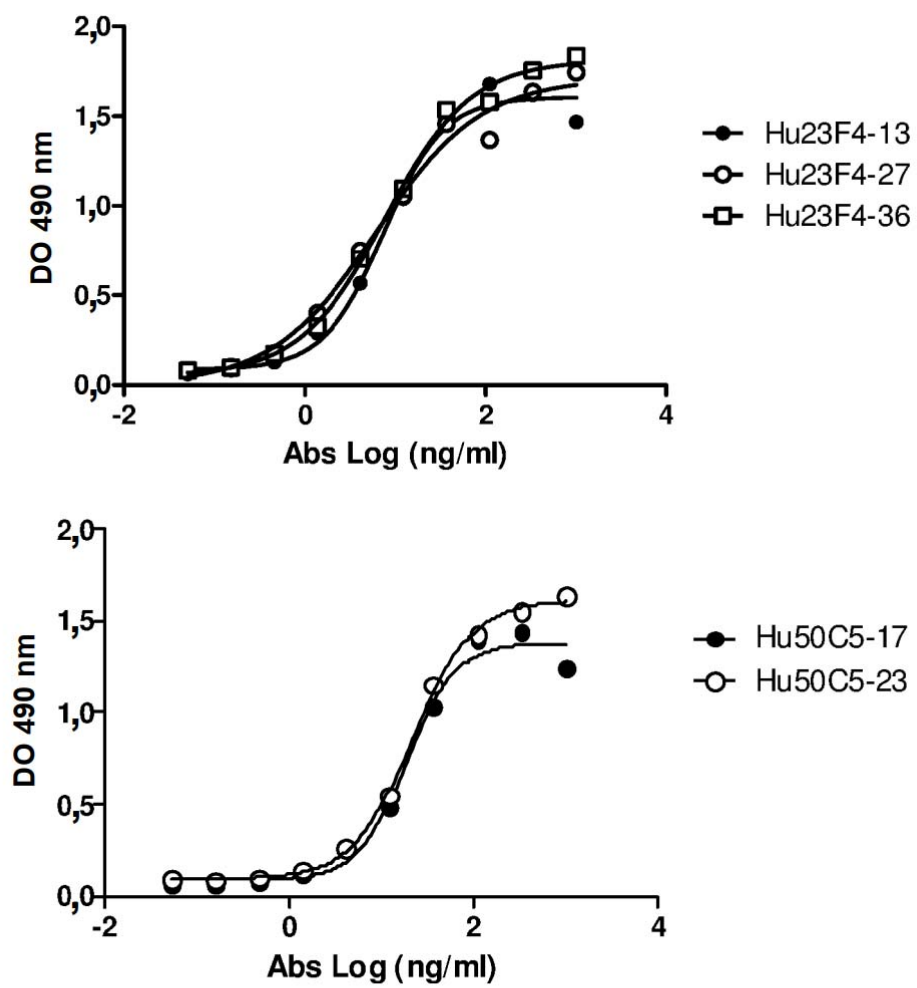


FIG. 11

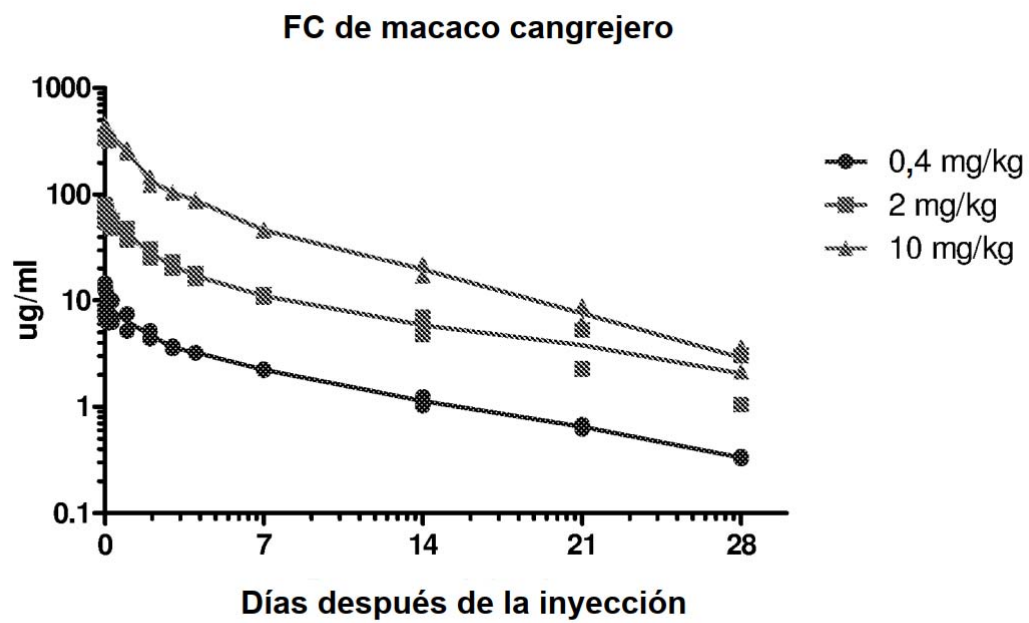


FIG. 12