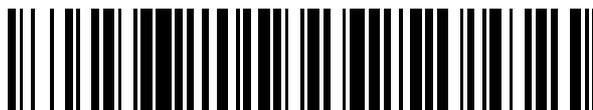


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 454**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010 E 10794936 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2510010**

54 Título: **Anticuerpos que se unen al dominio extracelular 4 de CSF1R humana y su utilización**

30 Prioridad:

10.12.2009 EP 09015310

19.08.2010 EP 10173407

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

26.01.2016

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

DIMOUDIS, NIKOLAOS;

FERTIG, GEORG;

FIDLER, ALEXANDER;

KALUZA, KLAUS;

THOMAS, MARLENE;

RIES, CAROLA;

SEEBER, STEFAN y

LANZENDOERFER, MARTIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 557 454 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 que se unen al dominio extracelular 4 de CSF1R humana y su utilización

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos contra CSF-1R humanos (anticuerpos anti-CSF-1R), los métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 El receptor humano de CSF-1 (CSF-1R, receptor 1 del factor estimulante de colonias; sinónimos: receptor de M-CSF; receptor 1 del factor estimulante de colonias de macrófagos, proto-oncogén Fms, c-fms, Id. de Sec. N°: 62) se conoce desde 1986 (Coussens, L., et al., *Nature* 320 (1986). 277-280). El CSF-1R es un factor de crecimiento y está codificado por el proto-oncogén c-fms (por ejemplo, revisado en Roth, P., y Stanley, E.R., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181 (1992) 141-67).

- 15 El CSF-1R es el receptor de CSF-1 (factor estimulante de colonias 1, también llamado M-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos) y media los efectos biológicos de esta citoquina (Sherr, C.J., et al., *Cell* 41 (1985) 665-676). La clonación del receptor 1 del factor estimulante de colonias (CSF-1R) (también llamado c-fms) fue descrita por primera vez en Roussel, M.F., et al., *Nature* 325 (1987) 549-552. En esa publicación, se demostró que CSF-1R tenía potencial transformador dependiente de los cambios en la cola C-terminal de la proteína incluyendo la pérdida de la fosforilación de la tirosina 969 inhibidora que se une Cbl y por lo tanto regula la regulación negativa del receptor (Lee, PS, et al., *EMBO J.* 18 (1999) 3616-3628). Recientemente, fue identificado un segundo ligando para CSF-1R denominado interleuquina-34 (IL-34) (Lin, H., et al., *Science* 320 (2008) desde 807-811).

- 25 La citoquina CSF-1 (factor estimulante de colonias 1, también llamado M-CSF, macrófago) se encuentra extracelularmente como un homodímero unido por disulfuro (Stanley, E.R. et al., *Journal of Cellular Biochemistry* 21 (1983) 151-159; Stanley, E.R. et al., *Stem Cells* 12 Supl. 1 (1995) 15-24).

- 30 Los principales efectos biológicos de la señalización de CSF-1R son la diferenciación, proliferación, migración y supervivencia de las células precursoras hematopoyéticas en el linaje de macrófagos (incluyendo los osteoclastos). La activación de CSF-1R está mediada por sus ligandos, CSF-1 (M-CSF) e IL-34. La unión de CSF-1 (M-CSF) a CSF-1R induce la formación de homodímeros y la activación de la quinasa mediante la fosforilación de tirosina (Li, W. et al., *EMBO Journal*.10 (1991) 277-288; Stanley, E.R., et al., *Mol. Reprod. Dev.* 46 (1997) 4-10).

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

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

- 50 La señalización de CSF-1R tiene un papel fisiológico en las respuestas inmunes, en la remodelación ósea y en el sistema reproductivo. Los animales knockout, ya sea para CSF-1 (Pollard, J.W., *Mol. Reprod. Dev.* 46 (1997) 54-61) o CSF-1R (Dai, X.M., et al., *Blood* 99 (2002) 111-120) han demostrado tener fenotipos osteopetrótico, hematopoyético, macrófagos de tejidos, y reproductivos consistentes con un papel para CSF-1R en los respectivos tipos de células.

- 55 Sherr, CJ, et al., *Blood* 73 (1989) 1786-1793 se refiere a algunos anticuerpos contra CSF-1R que inhiben la actividad CSF 1 (véase Sherr, C.J. et al., *Blood* 73 (1989) 1786- 1793). Ashmun, R.A., et al., *Blood* 73 (1989) 827-837 se refiere a anticuerpos CSF-1R. Lenda, D., et al., *Journal of Immunology* 170 (2003) 3254-3262 se refiere a la reducción del reclutamiento, la proliferación y la activación de macrófagos, en ratones deficientes de CSF-1 que resulta en una disminución de la apoptosis tubular durante la inflamación renal. Kitaura, H., et al., *Journal of Dental Research* 87 (2008) 396-400 se refiere a un anticuerpo anti -CSF-1 que inhibe el movimiento dental ortodóntico. WO 2001/030381 menciona inhibidores de la actividad de CSF-1 que incluye los nucleótidos antisentido y anticuerpos, mientras que describen sólo nucleótidos antisentido CSF-1. WO 2004/045532 se refiere a la prevención de metástasis y pérdida de hueso y tratamiento de cáncer metastásico mediante un antagonista de CSF-1 descrito solamente como anticuerpos antagonistas anti-CSF-1. WO 2005/046657 se refiere al tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino por anticuerpos anti-CSF-1. La patente US 2002/0141994 se refiere a inhibidores de factores estimulantes de colonias. WO 2006/096489 se refiere al tratamiento de la artritis reumatoide mediante

anticuerpos anti-CSF-1. WO 2009/026303 y WO 2009/112245 se relacionan con ciertos anticuerpos anti-CSF-1R que se unen a CSF-1R en los primeros tres subdominios (D1 a D3) del dominio extracelular (CSF-1R-ECD).

Resumen de la invención

5 La invención comprende un anticuerpo de unión a humano CSF-1R, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 8.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza porque

- 10 a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o
b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32, o
15 c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40, o
d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48, o
20 e) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 55 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 56.

La invención comprende además un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque

- 25 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 5, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 6, o
b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende
30 una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 22, o
c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 25, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 26, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende
35 una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 28, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 29, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 30, o
d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 33, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 34, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende
40 una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 36, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 37, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 38, o
e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 41, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 42, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende
45 una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 44, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 45, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 46, o
f) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 49, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 50, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende
50 una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 52, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 53, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 54.

Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG4 humana.

55 Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención.

60 Además, se da a conocer el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por CSF-1R.

La invención comprende además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

65 La invención comprende además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la pérdida ósea.

La invención comprende además el uso de un de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis.

5 La invención comprende además el uso de un de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Además, se da a conocer un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de una enfermedad mediada por CSF-1R.

10 La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento del cáncer.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de la pérdida ósea.

15 La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de la metástasis.

La invención comprende además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

20 Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque

25 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 5, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 6, o,

30 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 22, o

35 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 25, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 26, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 28, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 29, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 30, o

40 d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 33, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 34, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 36, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 37, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 38, o

45 e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 41, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 42, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 44, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 45, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 46, o

50 f) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 49, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 50, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 52, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 53, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 54.

Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 8.

55 Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza porque

60 a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o

b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32, o

65 c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40, o

d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48, o

e) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 55 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 56.

La invención proporciona además vectores de expresión que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procariota o eucariota no humana, y las células huésped que contienen tales vectores para la producción recombinante de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención comprende además una célula huésped procariota o eucariota no humana que comprende un vector de acuerdo con la invención.

La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo humano recombinante o humanizado de acuerdo con la invención, caracterizado por expresar un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped procariota o eucariota no humana y la recuperación de dicho anticuerpo a partir de dicha célula o el sobrenadante del cultivo celular. La invención comprende además el anticuerpo obtenido mediante dicho método recombinante.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran beneficios para los pacientes en necesidad de una terapia de localización de CSF-1R. Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran actividad antiproliferativa eficiente contra proliferación independiente de ligando y proliferación dependiente de ligando y por lo tanto son especialmente útiles en el tratamiento del cáncer y la metástasis.

Además, se da a conocer un método para tratar un paciente que sufre de cáncer, que comprende administrar a un paciente diagnosticado con una enfermedad tal (y por lo tanto estar en necesidad de dicha terapia) una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención. El anticuerpo se administra preferiblemente en una composición farmacéutica.

Por otra parte, se da a conocer un método para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer caracterizado por la administración al paciente de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Sorprendentemente, se ha encontrado que, usando un fragmento del D4 de CSF-1R humano en el que se eliminó el subdominio D4 de CSF-1R-ECD humano (Id. de Sec. N°: 65), podría seleccionarse el nuevo anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la invención. Estos anticuerpos muestran propiedades valiosas como excelente inhibición del crecimiento celular dependiente de ligando y al mismo tiempo la inhibición del crecimiento celular independiente de ligando de células NIH 3T3, infectadas con retrovirus, ya sea con un vector de expresión para CSF-1R de tipo salvaje de longitud completa (Id. de Sec. N°: 62) o CSF-1R L301S mutante Y969F (Id. de Sec. N°: 63) en el que las células recombinantes CSF-1R mutantes son capaces de formar esferoides independientes del ligando de CSF-1. Además, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la diferenciación de los macrófagos humanos y de cynomolgus (ambos), ya que inhiben la supervivencia de los monocitos humanos y de cynomolgus.

Descripción detallada de la invención

Se describe un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el anticuerpo se une al fragmento del D4 de CSF-1R humano (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (Id. de Sec. N°: 65) y al dominio extracelular CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (Id. de Sec. N°: 64) con una proporción de 1:50 ó inferior.

Se describe un anticuerpo caracterizado en comprender como región CDR3 del dominio variable de la cadena pesada una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 1, Id. de Sec. N°: 9, Id. de Sec. N°: 23, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 39, Id. de Sec. N°: 47 o Id. de Sec. N°: 55.

La invención comprende además un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 8.

En una realización, el anticuerpo que se une a CSF-1R humano, se caracteriza porque

a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o

b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32, o

- c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40, o
- 5 d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48, o
- e) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 55 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 56.
- 10 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza porque
- a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o
- 15 b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32, o
- c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40, o
- 20 d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o
- 25 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32.
- 30 En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48.
- 35 Se describe un anticuerpo caracterizado por el hecho de que el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 15 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 16, o una versión humanizada del mismo.
- Se describe un anticuerpo caracterizado por el hecho de que el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 75 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 76; o una versión humanizada del mismo.
- 40 Se describe un anticuerpo caracterizado por el hecho de que el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 83 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 84; o una versión humanizada del mismo.
- 45 La invención comprende además un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque
- a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 5, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 6, o,
- 50 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 22, o
- 55 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 25, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 26, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 28, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 29, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 30, o
- 60 d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 33, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 34, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 36, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 37, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 38, o
- 65

d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 41, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 42, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 44, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 45, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 46.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 22.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 25, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 26, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 28, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 29, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 30.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 33, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 34, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 36, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 37, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 38.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención que se caracteriza en que el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 41, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 42, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 44, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 45, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 46.

Se describe un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el anticuerpo se une al fragmento del D4 de CSF 1R humano (Id. de Sec. N°: 65) y a CSF-1R-ECD humano (Id. de Sec. N°: 64) con una relación de 1:50 o inferior, que se caracteriza además porque no se une al fragmento D1-D3 de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 66).

El término "anticuerpo" abarca las diversas formas de anticuerpos, incluyendo pero no limitándose a anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos sin el epítipo de células T, y otros anticuerpos manipulados genéticamente siempre y cuando se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente el dominio variable del mismo, o al menos el sitio de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos scFv, por ejemplo, se describen en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88). Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de cadena única que tienen las características de un dominio VH de unión a CSF-1R, es decir, ser capaz de ensamblar junto con un dominio VL, o un dominio de unión VL a CSF-1R, es decir, ser capaz de ensamblar junto con un dominio VH a un sitio de unión a antígeno funcional y proporcionando de ese modo la propiedad.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de un solo aminoácido.

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

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que han sido modificados el marco o "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) para comprender el CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, una CDR murina se injerta en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo Riechmann, L., et al, *Nature* 332 (1988) 323-327.; y Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Opcionalmente, la región marco puede ser modificada por mutaciones adicionales. También las CDR pueden modificarse por una o más mutaciones para generar anticuerpos de acuerdo con la invención, por ejemplo por

mutagénesis basada en modelado molecular como se describe por Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033, u otros. Las CDR particularmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen los antígenos observados anteriormente para los anticuerpos quiméricos. Una "versión humanizada de un anticuerpo de acuerdo con la invención" (que es, por ejemplo de origen murino) se refiere a un anticuerpo, que se basa en las secuencias de anticuerpos de ratón en el que el VH y VL se humanizan mediante técnicas estándar (incluyendo injerto de CDR y opcionalmente mutagénesis posterior de ciertos aminoácidos en la región marco y las CDR). Preferiblemente, tal versión humanizada está quimerizada con una región constante humana (véase, por ejemplo las secuencias de Id. de Sec. N°: 57 a 61).

Otras formas de "anticuerpos humanizados" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la región constante se ha modificado o cambiado, además de la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente en lo que respecta a la unión de C1q y/o unión de receptor Fc (FcR).

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

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

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por métodos recombinantes, tales como anticuerpos aislados a partir de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención han sido sometidos a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

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

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

El CSF-1R humano (receptor CSF-1; sinónimos: receptor de M-CSF; receptor 1 del factor estimulador de colonias de macrófagos, proto-oncogén Fms, c-fms, Id. de Sec. N°: 22)) es conocido desde 1986 (Coussens, L., et al., Nature 320 (1986) 277-280). CSF-1R es un factor de crecimiento y está codificado por el proto-oncogén c-fms (por ejemplo, revisado en Roth, P. y Stanley, E.R., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181 (1992) 141 a 67).

CSF-1R es el receptor de CSF-1 (factor estimulador de colonias de macrófagos, también llamado M-CSF) e IL-34 y media los efectos biológicos de estas citoquinas (Sherr, CJ, et al., Cell 41 (1985) 665-676 (Lin, H., et al., Science 320 (2008) 807-811). La clonación del receptor 1 del factor estimulador de colonias (también llamado c-fms) fue descrita por primera vez en Roussel, M.F., et al., Nature 325 (1987) 549-552. En dicha publicación, se demostró que CSF-1R tenía potencial transformador dependiente de los cambios en la cola C-terminal de la proteína incluyendo la pérdida de la fosforilación inhibitoria de la tirosina 969 que se une Cbl y de ese modo regula la desregulación de los receptores (Lee, P.S., et al., EMBO J. 18 (1999) 3616-3628).

CSF-1R es un receptor tirosina quinasa transmembrana (RTK) de cadena única, y un miembro de la familia de la inmunoglobulina (Ig) que contiene RTK caracterizados por 5 subdominios D1-D5 similares a Ig que se repiten en el dominio extracelular (ECD) del receptor (Wang, Z., et al., Molecular and Cellular Biology 13 (1993) 5348-5359). El dominio extracelular de CSF 1R humano (CSF-1R-ECD) (Id. de Sec. N°: 64) comprende los cinco subdominios D1-D5 extracelulares de Ig. El fragmento humano del D4 de CSF-1R (Id. de Sec. N°: 65) comprende los subdominios D1-D3 y D5 extracelulares de Ig, pero le falta el subdominio D4. El fragmento humano D1-D3 de CSF-1R (Id. de Sec. N°: 66) comprende los respectivos subdominios D1-D3. Las secuencias se enumeran sin el péptido señal MGSQPGVLLL LLVATAWHGQ G (Id. de Sec. N°: 67).

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

CSF-1R se expresa principalmente en células del linaje de monocitos y en el tracto reproductivo femenino y placenta. Adicionalmente la expresión de CSF-1R se ha descrito en las células de Langerhans en la piel, un subconjunto de células de músculo liso (Inaba, T., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 5693-5699), células B (Baker, A.H., et al., Oncogene 8 (1993) 371-378) y microglia (Sawada, M., et al., Brain Res. 509 (1990) 119-124). Las células con CSF-1R mutante humano (Id. de Sec. N°: 23) se conocen por proliferar de forma independiente de la estimulación por ligando.

Como se usa en este documento, "unión a CSF-1R humano" o "se une específicamente a CSF-1R humano" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CSF-1R humano con una afinidad de unión de valor KD de $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l o inferior a 35°C , en una realización de un valor KD de $1,0 \times 10^{-9}$ mol/l o inferior a 35°C . La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar a 35°C , tales como técnica de resonancia de plasmón superficial (BIAcore®, GE Healthcare-Uppsala, Suecia) Un método para determinar el valor KD de la afinidad de unión se describe en el Ejemplo 9. Así, un "anticuerpo de unión a CSF-1R humano" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CSF-1R humano con una afinidad de unión KD de $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l o inferior (preferiblemente $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l a $1,0 \times 10^{-12}$ mol/l) a 35°C , preferiblemente una KD de $1,0 \times 10^{-9}$ mol/l o inferior a 35°C (preferiblemente $1,0 \times 10^{-9}$ mol/l a $1,0 \times 10^{-12}$ mol/l).

La "unión a fragmento del D4 de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 65) y un dominio extracelular de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 64)" tal como se utiliza aquí se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón en superficie (ensayo BIAcore) como se describe en el Ejemplo 4. El fragmento del D4 de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 65) o dominio extracelular de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 64), respectivamente, se capturan a la superficie (cada uno a una superficie separada) y se añadieron los anticuerpos de prueba (cada uno en una medición separada) y se determinaron las señales de unión correspondientes (señal de unión (RU)). Las señales de referencia (superficie en blanco) se restaron. Si las señales de anticuerpos de prueba no unidas estuvieron ligeramente por debajo de 0 los valores se establecen como 0. Entonces se determina la relación de las señales de unión correspondientes (señal de unión (RU) para el fragmento del D4 de CSF-1R humano/señal de unión (RU) a dominio extracelular de CSF-1R humano (CSF-1R-ECD)). Los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen una relación de las señales de unión (RU (del D4)/ RU (CSF-1R-ECD) de 1:50 ó inferior, preferiblemente de 1:100 o inferior (el extremo inferior incluido es 0 (por ejemplo, si la RU es 0, entonces la relación es 0:50 o 0:100)).

Esto significa que tales anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención no se unen al fragmento del D4 de CSF-1R humano (como el anticuerpo anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18.08.2004 en DSMZ) y tienen señales de unión para la unión al fragmento del D4 de CSF-1R humano en el rango del anticuerpo anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5, que están por debajo de 20 RU (unidades de respuesta), preferiblemente por debajo de 10 RU en un ensayo de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) como se muestra en el Ejemplo 4.

- 5 El término "fragmento D1-D3 de unión a CSF-1R humano" se refiere a una determinación de la afinidad de unión mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial (ensayo Biacore). El anticuerpo de ensayo se captura a la superficie y se añadió el fragmento D1-D3 de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 66) y se determinaron las correspondientes afinidades de unión. El término "no se une al fragmento D1-D3 de CSF-1R humano" indica que, en un ensayo de este tipo la señal detectada estaba en el área de no más de 1,2 veces de la señal de fondo y por lo tanto no puede detectarse una unión significativa y tampoco puede determinarse la afinidad de unión (véase el Ejemplo 10).
- 10 Una realización de la descripción es un método de cribado para la selección de anticuerpos de acuerdo con la invención que comprende los siguientes pasos:
- 15 a) determinar la señal de unión (unidades de respuesta (RU)) de anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 65) y al dominio extracelular CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (Id. de Sec. N°: 64) mediante un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (ensayo Biacore).
- 20 b) seleccionar anticuerpos con una proporción de las señales de unión (fragmento delD4 de CSF-1R humano/dominio extracelular CSF-1R humano (CSF-1R-ECD)) de 50:1 o inferior.
- 25 En una realización, la determinación se realiza a 25°C.
- 30 En una realización, el método de cribado comprende como medidas adicionales de la medición de la unión de anticuerpos anti-CSF 1R al fragmento D1-D3 de CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 66) (D1-D3) y la selección de anticuerpos que no muestran la unión a dicho fragmento.
- 35 El término "epítipo" denota un determinante de proteína de CSF-1R humano capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente los epítipos tienen tres características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes de desnaturalización. Preferiblemente un anticuerpo de acuerdo con la invención se une específicamente a CSF-1R nativo y desnaturalizado.
- 40 El "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), dominio variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza aquí indica cada uno del par de dominios de cadena ligera y pesada que están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación en lámina β y los CDR pueden formar bucles que conectan la estructura en lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de la cadena pesada y ligera del anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la especificidad de unión/afinidad de los anticuerpos de acuerdo con la invención.
- 45 El término "porción de unión a antígeno de un anticuerpo" cuando se usa aquí, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La porción de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las regiones "FR" o "marco" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable como se define aquí. Por lo tanto, los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden de N a C terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión del antígeno y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo a la definición estándar de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los residuos de un "bucle hipervariable".
- 50 Los términos "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", como se usa aquí, pretende incluir moléculas de DNA y moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es DNA bicatenario.
- 55 El término "aminoácido" como se usa en esta solicitud significa el grupo de carboxi α -aminoácidos de origen natural que comprende alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), ácido glutámico (Glu, E), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (ile, I), leucina (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (Tyr, Y), y valina (val, V).
- 60

En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la unión de CSF-1 a CSF-1R. En una forma de realización con una CI50 de 200 ng/ml o inferior, en una realización con una CI50 de 50 ng/ml o inferior. La CI50 de inhibición de la unión de CSF-1 a CSF-1R se puede determinar como se muestra en el Ejemplo 2.

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

10 En una forma de realización con una CI50 de 800 ng/ml o inferior, en una realización con una CI50 de 600 ng/ml o inferior, en una realización con una CI50 de 250 ng/ml o inferior. El CI50 de la fosforilación de CSF-1R inducida por CSF-1 puede determinarse como se muestra en el Ejemplo 3.

15 En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben el crecimiento de células NIH3T3 recombinantes que expresan CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 62). En una forma de realización con una CI50 de 10 µg/ml o inferior, en una realización con una CI50 de 5 µg/ml o inferior, en una realización con una CI50 de 2 µg/ml o inferior. En una forma de realización con un CI30 de 10 µg/ml o inferior, en una realización con una CI30 de 5 µg/ml o inferior, en una realización con un CI30 de 2 µg/ml o inferior. El valor de CI50, el valor de CI30 o el % de inhibición del crecimiento se determina como se muestra en el Ejemplo 5.

20 En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben el crecimiento de células NIH3T3 recombinantes que expresan CSF-1R humana mutante Y969F L301S (Id. de Sec. N°: 63). En una forma de realización con una CI50 de 15 µg/ml o inferior, en una realización con una CI50 de 10 µg/ml o inferior. En una forma de realización con un CI30 de 10 µg/ml o inferior, en una realización con una CI50 de 5 µg/ml ng/ml o inferior; en una realización con una CI50 de 2 µg/ml o inferior. El valor de CI50, el valor de CI30 o el % de inhibición del crecimiento se determina como se muestra en el Ejemplo 5.

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

30 En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la diferenciación de macrófagos humanos y de cynomolgus (ambos) (que se indica mediante la inhibición de la supervivencia de monocitos humanos y de cynomolgus como se muestra en los Ejemplos 7 y 8). En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la supervivencia de los monocitos humanos con una CI50 de 0,15 µg/ml o inferior, en la forma de realización con una CI50 de 0,10 µg/ml o inferior. La inhibición de la supervivencia de monocitos humanos se determina como se muestra en el Ejemplo 7. En una realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la supervivencia de monocitos cynomolgus en un 80% o más, en una realización en un 90% o más (en una concentración de anticuerpo de 5 µg/ml, y en comparación con la ausencia de anticuerpo). La inhibición de la supervivencia de monocitos humanos se determina como se muestra en el Ejemplo 8.

40 Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo contra CSF-1R caracterizado porque la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de clase IgG1 humana que se une a CSF-1R humano de acuerdo con la invención, dicho ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo se insertan en un vector de expresión modificado, dicho vector se introduce en una célula huésped eucariota, la proteína codificada se expresa y se recupera de la célula huésped o del sobrenadante.

50 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferentemente por métodos recombinantes. Por lo tanto el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal aislado. Dichos métodos recombinantes son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas con el posterior aislamiento del polipéptido del anticuerpo y por lo general la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, se insertan los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas o sus fragmentos en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariontas o eucariotas adecuadas como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras, o células de E. coli, y el anticuerpo se recupera de las células (sobrenadante o células después de la lisis). La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R. J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

60 Los anticuerpos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se lleva a cabo con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y

otros bien conocidos en la técnica. Véase Ausubel, F., et al., Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

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

Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente al DNA para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilita la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen porque estar contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se utilizan adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o conectores de acuerdo con la práctica convencional.

Los anticuerpos monoclonales se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. El DNA y RNA que codifica los anticuerpos monoclonales se aíslan fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de dicho DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que luego son transfectados en células huésped tales como células HEK 293, células CHO, o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Tal como se usa en este documento, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente y todas estas designaciones incluyen a la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen las variantes de la progenie que tienen la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula originalmente transformada.

La "parte Fc" de un anticuerpo no está involucrada directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por el experto en la materia y está definido sobre la base de la escisión con papaína de los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, IgA1, e IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de cadena pesada de las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo está directamente involucrada en la CCDA (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), basada en la activación del complemento, unión a C1q y la unión al receptor Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de las subclases de anticuerpos IgG. Mientras que la influencia de un anticuerpo en el sistema del complemento es dependiente de ciertas condiciones, la unión a C1q está causada por los sitios de unión definidos en la parte Fc. Tales sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y se describen por ejemplo, en Boackle, R.J., et al., *Nature* 282 (1979) 742-743, Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse, R., y Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917, Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344, Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004, Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184, Hezareh, M., et al., *J. Virology* 75 (2001) 12161-12168, Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324, PE 0307434. Tales sitios de unión son, por ejemplo L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo al índice de Kabat, EA de la UE, véase más adelante). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran la activación del complemento y unión a C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento y no compromete a C1q y C3.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una parte Fc derivada de origen humano y, preferiblemente, todas las otras partes de las regiones constantes humanas. Tal como se utiliza aquí, el término

- "parte Fc derivada de origen humano" denota una parte Fc que es o bien una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferiblemente una parte Fc de la subclase IgG1 humana, una parte Fc mutada de la subclase IgG1 humana (preferiblemente con una mutación en L234A + L235A), una parte Fc de la subclase IgG4 humano o una parte Fc mutada de la subclase IgG4 humana (preferiblemente con una mutación en S228P). Parcialmente preferidas son las regiones constantes de cadena pesada humana de Id. de Sec. N°: 58 (subclase IgG1 humana), Id. de Sec. N°: 59 (subclase IgG1 humana con mutaciones L234A y L235A), Id. de Sec. N°: 60 (subclase IgG4 humana), o Id. de Sec. N°: 61 (subclase IgG4 humana con la mutación S228P).
- Preferiblemente, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG1 humana o de la subclase IgG4 humana. En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG1 humana. En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es de la subclase IgG4 humana.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza porque las cadenas constantes son de origen humano. Tales cadenas constantes son bien conocidas en el estado de la técnica y, por ejemplo se describen en Kabat, E.A., (véase, por ejemplo Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 58. Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena ligera kappa de Id. de Sec. N°: 57.
- Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque
- a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 8.
- Se describe un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque
- a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 8,
- b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 15 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 16;
- c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 75 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 76;
- d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 83 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 84; o una versión humanizada del mismo.
- Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 8.
- Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a humano CSF-1R, caracterizado porque
- a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o
- b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32, o
- c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40, o
- d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48, o
- e) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 55 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 56.
- Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque
- a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o
- b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32, o

c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40, o

5 d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o

10 Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40.

15 Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48.

20 Otro aspecto es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 15 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 16, o una versión humanizada del mismo.

Se describe un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 75 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 76; o una versión humanizada del mismo.

Se describe un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 83 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 84; o una versión humanizada del mismo.

30 Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque

a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 5, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 6, o,

40 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 22, o

45 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 25, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 26, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 28, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 29, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 30, o

50 d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 33, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 34, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 36, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 37, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 38, o

55 e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 41, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 42, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 44, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 45, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 46,

60 f) del dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 49, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 50, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 52, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 53, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 54.

Otro aspecto de la invención es un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque

65 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende

Se describe un método para el tratamiento de un paciente en necesidad de terapia, caracterizado por administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Se describe el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la terapia.

Se describen los anticuerpos CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento de "enfermedades mediadas por CSF-1R" o los anticuerpos CSF-1R de la presente invención para su uso para la fabricación de un medicamento en el tratamiento de "enfermedades mediadas por CSF-1R", que se pueden describir de la siguiente manera:

Existen 3 mecanismos diferentes por los que la señalización de CSF-1R es probable que participe en el crecimiento tumoral y la metástasis. La primera es que se ha encontrado que la expresión de ligando y receptor de CSF en las células tumorales originadas en el sistema reproductor femenino (mama, ovario, endometrio, cuello del útero) (Scholl, S.M., et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 120-126; Kacinski, B.M., *Mol. Reprod. Dev.* 46 (1997) 71-74; Ngan, H.Y., et al., *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 1546-1550; Kirma, N., et al., *Cancer Res.* 67 (2007) 1918-1926) y la expresión se ha asociado con el crecimiento de xenoinjerto de cáncer de mama, así como mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Se observaron dos mutaciones puntuales en CSF-1R en aproximadamente el 10-20% de los pacientes con leucemias mielocíticas agudas, leucemias mielocíticas crónicas y en pacientes con mielodisplasia analizados en un estudio, y una de las mutaciones se encontró que interrumpe el recambio de receptor (Ridge, S.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1377-1380). Sin embargo, la incidencia de las mutaciones no pudo confirmarse en estudios posteriores (Abu-Duhier, F.M., et al., *Br. J. Haematol.* 120 (2003) 464-470). Las mutaciones también se encontraron en algunos casos de cáncer hepatocelular (Yang, D.H., et al., *Hepatobiliar Pancreat. Dis. Int.* 3 (2004) 86-89) y mielofibrosis idiopática (Abu-Duhier, F.M., et al., *Br. J. Haematol.* 120 (2003) 464-470). Recientemente, en la línea celular GDM-1 derivada de un paciente con leucemia mielomonoblástica se identificó la mutación Y571D en CSF-1R (Chase, A., et al., *Leukemia* 23 (2009) 358-364). Sinovitis vellonodular pigmentada (SVP) y los tumores tenosinoviales de células gigantes (TTCG) pueden ocurrir como resultado de una translocación que fusiona el gen M-CSF a un gen del colágeno COL6A3 y resulta en la sobreexpresión de M-CSF (West, R.B., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 690-695). Un efecto paisaje se propone como responsable de la masa tumoral resultante que consiste en células monocíticas atraídas por las células que expresan M-CSF. Los TTCCG son tumores más pequeños que pueden ser relativamente fáciles de retirar de los dedos en los que en su mayoría se producen. SVP es más agresivo, ya que puede repetirse en las articulaciones grandes y no se controla con la misma facilidad quirúrgicamente.

El segundo mecanismo se basa en el bloqueo de la señalización a través M-CSF/CSF-1R en los sitios metastásicos en el hueso que induce la osteoclastogénesis, la resorción ósea y las lesiones óseas osteolíticas. Los cánceres de mama, mieloma múltiples y de pulmón son ejemplos de los cánceres que se han encontrado que hacen metástasis al hueso y causan la enfermedad ósea osteolítica que resulta en complicaciones esqueléticas. La M-CSF liberada por las células tumorales y el estroma induce la diferenciación de progenitores hematopoyéticos de monocitos mieloides para madurar los osteoclastos en colaboración con el receptor activador del factor nuclear kappa B ligando RANKL. Durante este proceso, M-CSF actúa como un factor permisivo dando la señal de supervivencia a los osteoclastos (Tanaka, S., et al., *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 257 a 263). La inhibición de la actividad de CSF-1R durante la diferenciación de los osteoclastos y la maduración con un anticuerpo anti-CSF-1R es probable que evite la actividad desequilibrada de los osteoclastos que provocan la enfermedad osteolítica y los eventos asociados relacionados con el esqueleto en la enfermedad metastásica. Considerando que el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y el mieloma múltiple suelen dar lugar a lesiones osteolíticas, la metástasis al hueso en el cáncer de próstata inicialmente tiene una apariencia osteoblástica en el que el aumento de la formación de hueso resulta de la actividad en "hueso reticular" que es diferente de la típica estructura laminar del hueso normal. Durante la progresión de la enfermedad, las lesiones óseas osteolíticas muestran un componente significativo, así como altos niveles séricos de resorción ósea y sugiere que la terapia anti-resorción puede ser útil. Los bifosfonatos han demostrado inhibir la formación de lesiones osteolíticas y redujeron el número de eventos relacionados con el esqueleto sólo en hombres con cáncer de próstata metastásico hormono-refractario, pero en este momento su efecto sobre las lesiones osteoblásticas es controvertido y los bifosfonatos no han sido beneficiosos en la prevención de metástasis ósea o en el cáncer de próstata sensible a hormona. El efecto de los agentes antirresortivos en el cáncer de próstata mixta osteolítica/osteoblástica todavía se está estudiando en la clínica (Choueiri, M.B., et al., *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 601-609; Vessella, R.L. y Corey, E., *Clin. Cancer Res.* 12 (20 Pt 2) (2006) 6285-6290). El tercer mecanismo se basa en la reciente observación de que los macrófagos asociados al tumor (MAT) se encuentran en tumores sólidos de mama, de próstata, de ovario y cánceres cervicales correlacionados con mal pronóstico (Bingle, L., et al., *J. Pathol.* 196. (2002) 254-265; Pollard, J.W., *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 71-78). Los macrófagos son reclutados por el tumor mediante M-CSF y otras quimiocinas. Los macrófagos pueden contribuir entonces a la progresión del tumor a través de la secreción de factores angiogénicos, proteasas y otros factores de crecimiento y citoquinas y pueden bloquearse mediante la inhibición de la señalización de CSF-1R. Recientemente se demostró por Zins et al. (Zins, K., et al., *Cancer Res.* 67 (2007) 1038 a 1045) que la expresión de siRNA de factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), M-CSF o la combinación de ambos reduciría el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de ratón entre un 34% y un 50% después de la inyección intratumoral de la correspondiente siRNA. Los siRNA dirigidos al TNF alfa secretado por las células SW620 humanas reduce los niveles de M-CSF de ratón y conduce a la reducción de los macrófagos en el tumor. Además, el tratamiento xenoinjertos tumorales MCF7

con un fragmento de unión a antígeno dirigido contra M-CSF dio como resultado la inhibición del crecimiento del tumor en un 40%, revirtió la resistencia a la quimioterapia y la mejora de la supervivencia de los ratones cuando se administra en combinación con agentes quimioterapéuticos (Paulus, P., et al., *Cancer Res.* 66 (2006) 4349-4356).

5 Los MAT son sólo un ejemplo de un enlace emergente entre la inflamación crónica y el cáncer. Hay evidencia adicional entre un enlace entre la inflamación y el cáncer como muchas enfermedades crónicas están asociadas con un mayor riesgo de cáncer, los cánceres surgen en sitios de inflamación crónica, los mediadores químicos de la inflamación se encuentran en muchos tipos de cáncer; la eliminación de los mediadores celulares o químicos de la inflamación inhibe el desarrollo de los cánceres experimentales y el uso a largo plazo de los agentes anti-inflamatorios reducen el riesgo de algunos tipos de cáncer. Existe una relación con el cáncer para una serie de condiciones inflamatorias entre ellas la gastritis inducida por *H. pylori* para el cáncer gástrico, esquistosomiasis para cáncer de vejiga, HHVX para el sarcoma de Kaposi, endometriosis para cáncer de ovario y prostatitis para el cáncer de próstata (Balkwill, F., et al., *Cancer Cell* 7 (2005) 211 a 217). Los macrófagos son células clave en la inflamación crónica y responden diferencialmente a su microambiente. Existen dos tipos de macrófagos que se consideran 15 extremos en un continuo de estados funcionales: los macrófagos M1 están implicados en reacciones de tipo 1. Estas reacciones implican la activación por productos microbianos y la consiguiente muerte de los microorganismos patógenos que dan lugar a productos intermedios de oxígeno reactivo. En el otro lado del extremo están los macrófagos M2 implicados en reacciones de tipo 2 que promueven la proliferación celular, la inflamación y la inmunidad adaptativa y promueven la remodelación tisular, la angiogénesis y la reparación (Mantovani, A., et al., *Trends Immunol.* 25 (2004) 677-686). La inflamación crónica que resulta en el establecimiento de la neoplasia se asocia generalmente con los macrófagos M2. Una citoquina fundamental que media las reacciones inflamatorias es TNF alfa que siendo fiel a su nombre puede estimular la inmunidad anti-tumoral y la necrosis hemorrágica en dosis altas, pero también se ha encontrado recientemente que se expresa por las células tumorales y actúa como un promotor tumoral (Zins, K., et al, *Cancer Res* 67 (2007) 1038-1045; Balkwill, F., *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 409-416). El papel específico de los macrófagos con respecto al tumor todavía necesita entenderse mejor 25 incluyendo la dependencia espacial y temporal potencial en su función y la relevancia de los tipos de tumores específicos.

Por lo tanto una forma de realización de la invención son los anticuerpos CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer. El término "cáncer" como se utiliza aquí puede ser, por ejemplo, cáncer de pulmón, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), el cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, 35 cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroideas, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje 40 espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, Schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma de hipófisis, linfoma, leucemia linfocítica, incluidas las versiones refractarias de cualquiera de los tipos de cáncer anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. Preferiblemente, dicho cáncer es un cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de pulmón o cáncer de próstata. Preferiblemente dichos cánceres se caracterizan además por expresión o sobreexpresión de CSF-1 o CSF-1R. Una forma de realización adicional de la invención son los anticuerpos CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento simultáneo de tumores primarios y nuevas metástasis. 45

Otro aspecto de la descripción son los anticuerpos CSF-1R de la presente invención para su uso en el tratamiento de la periodontitis, la histiocitosis X, la osteoporosis, la enfermedad de Paget de los huesos (PDB), pérdida ósea debido a la terapia del cáncer, osteolisis periprotésica, osteoporosis inducida por glucocorticoides, la artritis reumatoide, la artritis psoriásica, la osteoartritis, artritis inflamatorias, e inflamación. Rabello, D., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 791-796 ha demostrado que los SNP en el gen CSF1 muestra una asociación positiva con la periodontitis agresiva: una enfermedad inflamatoria de los tejidos periodontales que causa la pérdida de dientes debido a la resorción del hueso alveolar. 50

La histiocitosis X (también llamada histiocitosis de células de Langerhans, HCL) es una enfermedad proliferativa de las células dendríticas de Langerhans que parecen diferenciarse en osteoclastos en el hueso y lesiones óseas de HCL adicionales. Las células de Langerhans derivan de los monocitos circulantes. Los niveles elevados de M-CSF medidos en los sueros y las lesiones se encontró que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (da Costa, C.E., et al., *J. Exp. Med.* 201 (2005) 687-693). La enfermedad se presenta principalmente en una población de pacientes pediátricos y tiene que ser tratada con quimioterapia cuando la enfermedad se convierte en sistémica o es recurrente. 60

La fisiopatología de la osteoporosis está mediada por la pérdida de los osteoblastos que forman hueso y un aumento de la resorción ósea osteoclástica dependiente. Se han descrito datos que lo apoyan en Cenci et al. que muestran 65

que una inyección de anticuerpos anti-M-CSF conserva la densidad ósea e inhibe la resorción ósea en ratones ovariectomizadas (Cenci, S., et al., *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 1279-1287). Recientemente se identificó un posible vínculo entre la pérdida ósea postmenopáusica debida a la deficiencia de estrógenos y se encontró que la presencia de células T productoras de TNF alfa afecta el metabolismo óseo (Roggia, C., et al., *Minerva Med.* 95 (2004) 125-132). Un mecanismo posible podría ser la inducción de M-CSF mediante TNF alfa in vivo. Un papel importante de M-CSF en la osteoclastogénesis inducida por TNF-alfa fue confirmado por el efecto de un anticuerpo dirigido contra M-CSF que bloqueaba la osteolisis inducida por TNF alfa en ratones y por lo tanto haciendo que los inhibidores de la señalización de CSF-1R sean objetivos potenciales para la artritis inflamatoria (Kitaura, H., et al., *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3418-3427).

La enfermedad de Paget del hueso (PDB) es el segundo trastorno de metabolismo óseo más común después de la osteoporosis en la que las anomalías focales del aumento de recambio óseo conduce a complicaciones como dolor óseo, deformidades, fracturas patológicas y sordera. Se han identificado mutaciones en cuatro genes que regulan la función normal de los osteoclastos y predisponen a los individuos a PDB y trastornos relacionados: mutaciones de inserción en TNFRSF11A, que codifica el receptor activador del factor nuclear (NF) kappaB (RANK) – un regulador crítico de la función de los osteoclastos, las mutaciones que inactivan de TNFRSF11B que codifica la osteoprotegerina (un receptor señuelo para el ligando RANK), las mutaciones del gen secuestrosoma 1 (SQSTM1), que codifica una proteína de andamiaje importante en la vía de NFkappaB y las mutaciones en el gen de la proteína que contiene valosina (VCP). Este gen codifica VCP, que tiene un papel en la selección del inhibidor de NFkappaB para la degradación por el proteasoma (Daroszewska, A. y Ralston, SH, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2 (2006) 270-277). Los inhibidores dirigidos a CSF-1R ofrecen la oportunidad de bloquear la desregulación de la señalización RANKL indirectamente y añadir una opción de tratamiento adicional a los bifosfonatos que se utilizan actualmente.

La terapia del cáncer que induce pérdida de hueso especialmente en pacientes con cáncer de mama y de próstata es una indicación adicional en donde un inhibidor dirigido a CSF-1R podría prevenir la pérdida ósea (Lester, J.E., et al., *Br. J. Cancer* 94 (2006) 30- 35). Con la mejora del pronóstico para el cáncer de mama temprano las consecuencias a largo plazo de las terapias adyuvantes se vuelven más importantes ya que algunas de las terapias incluyendo la quimioterapia, irradiación, inhibidores de la aromatasa y la ablación de ovario afectan el metabolismo óseo por la disminución de la densidad mineral ósea, lo que resulta en un mayor riesgo de osteoporosis y fracturas asociadas (Lester, J.E., et al., *Br. J. Cancer* 94 (2006) 30-35). El equivalente a la terapia adyuvante inhibidora de la aromatasa en el cáncer de mama es la terapia de ablación de andrógenos en el cáncer de próstata que conduce a la pérdida de la densidad mineral ósea y aumenta significativamente el riesgo de fracturas relacionadas con la osteoporosis (Stoch, S.A., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 2787-2791).

La inhibición selectiva de la señalización de CSF-1R es probable que sea beneficiosa en otras indicaciones, así cuando los tipos de células específicas incluyen los osteoclastos y los macrófagos por ejemplo, el tratamiento de las complicaciones específicas en respuesta al reemplazo de la articulación como consecuencia de la artritis reumatoide. El fracaso del implante debido a la pérdida ósea periprotésica y el consiguiente aflojamiento de las prótesis es una complicación importante en el reemplazo de articulaciones y requiere repetir la cirugía con cargas socioeconómicas altas para el paciente y el sistema de atención de salud. Hasta la fecha, no existe una terapia con medicamento aprobada para prevenir o inhibir la osteolisis periprotésica (Drees, P., et al., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3 (2007) 165-171).

La osteoporosis inducida por glucocorticoides (GIOP) es otra indicación en la que un inhibidor de CSF-1R puede prevenir la pérdida ósea después del uso de glucocorticocosteroideos a largo plazo que se da como resultado de varias condiciones entre otras la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el asma y la artritis reumatoide (Guzman-Clark, J.R., et al., *Arthritis Rheum.* 57 (2007) 140-146; Feldstein, A.C., et al., *Osteoporos. Int.* 16 (2005) 2168-2174).

La artritis reumatoide, artritis psoriásica y artritis inflamatorias son en sí potenciales indicaciones para inhibidores de la señalización de CSF-1R que consisten de un componente de los macrófagos y a una destrucción ósea de grado variable (Ritchlin, C.T., et al., *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 821-831). La osteoartritis y la artritis reumatoide son una enfermedad autoinmune inflamatoria causada por la acumulación de macrófagos en el tejido conectivo y la infiltración de macrófagos en el líquido sinovial, que está al menos mediada parcialmente por M-CSF. Campbell, I., K., et al., *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 144-150, demostraron que M-CSF se produce en las células de la articulación del tejido humano (condrocitos, fibroblastos sinoviales) in vitro y se encuentra en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, lo que sugiere que contribuye a la proliferación de tejido sinovial y la infiltración de macrófagos que se asocia con la patogénesis de la enfermedad. La inhibición de la señalización de CSF-1R es probable que controle el número de macrófagos en la articulación y alivie el dolor asociado a la destrucción ósea. A fin de minimizar los efectos adversos y para entender mejor el impacto de la señalización de CSF-1R en estas indicaciones, un método consiste en inhibir específicamente CSF-1R sin afectar a la miríada de otras quinasas, tales como Raf quinasa.

La literatura reciente describe la correlación del aumento de circulación de M-CSF con un mal pronóstico y la progresión aterosclerótica en la enfermedad arterial coronaria crónica (Saitoh, T., et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 35 (2000) 655-665; Ikonomidis, I., et al., *Eur. Heart. J.* 26 (2005) p. 1618-1624); M-CSF influye en el proceso

aterosclerótico ayudando a la formación de células espumosas (macrófagos con LDL oxidada ingerido) que expresan CSF-1R y representan la placa inicial (Murayama, T., et al., *Circulation* 99 (1999) 1740-1746).

5 La expresión y la señalización de la M-CSF y CSF-1R se encuentra en la microglia activada. La microglía, que son macrófagos residentes del sistema nervioso central, pueden ser activados por varias agresiones, incluida la infección y la lesión traumática. M-CSF se considera un regulador clave de respuestas inflamatorias en el cerebro y los niveles de M-CSF aumentan con VIH-1, encefalitis, enfermedad de Alzheimer (EA) y tumores en el cerebro. La microgliosis como consecuencia de la señalización autocrina por MCSF/ CSF-1R resulta en la inducción de la liberación de citoquinas inflamatorias y óxido de nitrógeno como se demuestra por ejemplo, utilizando un modelo experimental de
10 daño neuronal (Hao, A.J., et al., *Neuroscience* 112 (2002) 889-900; Murphy, G.M., Jr., et al., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 20967-20971). La microglía que posee una expresión aumentada de CSF-1R se encuentra rodeando las placas en la EA y en la proteína precursora amiloide V717F en el modelo de ratón transgénico de EA (Murphy, G.M., Jr., et al., *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 895-904). Por otro lado los ratones op/op con menos microglia en el cerebro dio lugar a la deposición fibrilar de A-beta y la pérdida neuronal en comparación con el control normal lo que sugiere que la microglía no tiene una función neuroprotectora en el desarrollo de la EA de la que carecen los ratones op/op
15 (Kaku, M., et al., *Brain Res. Brain Res. Protoc* 12 (2003) 104-108).

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

La invención comprende un anticuerpo de unión a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente y fragmentos de secuencia de aminoácidos para el tratamiento del cáncer.
25

La invención comprende un anticuerpo de unión a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente y fragmentos de secuencia de aminoácidos para el tratamiento de la pérdida ósea.

30 La invención comprende un anticuerpo de unión a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente y fragmentos de secuencia de aminoácidos para la prevención o tratamiento de metástasis.

35 La invención comprende un anticuerpo de unión a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente y fragmentos de secuencias de aminoácidos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado porque comprende la unión del anticuerpo a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente y fragmentos de la
40 secuencia de aminoácidos para el tratamiento del cáncer o, alternativamente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

45 La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado porque comprende la unión del anticuerpo a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente y fragmentos de la secuencia de aminoácidos para el tratamiento de la pérdida ósea o, alternativamente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la pérdida ósea.

50 La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado porque comprende la unión del anticuerpo a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos mencionados anteriormente y fragmentos de la secuencia de aminoácidos para la prevención o tratamiento de metástasis o, alternativamente, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la metástasis.

55 La invención comprende el uso de un anticuerpo caracterizado porque comprende la unión del anticuerpo a CSF-1R humano que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos anteriormente mencionados y fragmentos de la secuencia de aminoácidos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o, alternativamente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

60 Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo contra CSF-1R caracterizado porque la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de clase IgG1 humano de unión a CSF-1R humano de acuerdo con la invención, dicho ácido nucleico y el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo se insertan en un vector de expresión modificado, dicho vector se introduce en una célula huésped eucariota, la proteína codificada se expresa y se recupera de la célula huésped o el sobrenadante.

65 Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferentemente por métodos recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células

procariontas y eucariontas con el posterior aislamiento del polipéptido del anticuerpo y por lo general la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas se insertan en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariontas o eucariontas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras, o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (a partir del sobrenadante o después de la lisis de células).

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

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

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

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

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

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

En este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción/agentes que retrasan la resorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para inyección o infusión.

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

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Además de agua, el vehículo puede ser, por ejemplo, una solución salina isotónica tamponada.

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

Los niveles de dosificación actuales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta

5 terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente (cantidad eficaz). El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en la artes médicas.

10 La invención comprende el uso de los anticuerpos de acuerdo con la invención para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer, especialmente cáncer de colon, de pulmón o de páncreas.

La descripción comprende también un método para el tratamiento de un paciente que sufre de tal enfermedad.

15 La invención proporciona además un método para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo de acuerdo con la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y el uso del anticuerpo de acuerdo con la invención para un método de este tipo.

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

25 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención en una cantidad eficaz para la fabricación de un agente farmacéutico, preferiblemente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención.

30 Descripción de las secuencias

30	Id. de Sec. Nº: 1	CDR3 de la cadena pesada, Mab 2F11
	Id. de Sec. Nº: 2	CDR2 de la cadena pesada, Mab 2F11
	Id. de Sec. Nº: 3	CDR1 de la cadena pesada, Mab 2F11
	Id. de Sec. Nº: 4	CDR3 de la cadena ligera, Mab 2F11
35	Id. de Sec. Nº: 5	CDR2 de la cadena ligera, Mab 2F11
	Id. de Sec. Nº: 6	CDR1 de la cadena ligera, Mab 2F11
	Id. de Sec. Nº: 7	dominio variable de la cadena pesada, Mab 2F11
	Id. de Sec. Nº: 8	dominio variable de la cadena ligera, Mab 2F11
	Id. de Sec. Nº: 9	CDR3 de la cadena pesada, Mab 2E10
40	Id. de Sec. Nº: 10	CDR2 de la cadena pesada, Mab 2E10
	Id. de Sec. Nº: 11	CDR1 de la cadena pesada, Mab 2E10
	Id. de Sec. Nº: 12	CDR3 de la cadena ligera de, Mab 2E10
	Id. de Sec. Nº: 13	CDR2 de la cadena ligera, Mab 2E10
	Id. de Sec. Nº: 14	CDR1 de la cadena ligera, Mab 2E10
45	Id. de Sec. Nº: 15	dominio variable de la cadena pesada, Mab 2E10
	Id. de Sec. Nº: 16	dominio variable de la cadena ligera, Mab 2E10
	Id. de Sec. Nº: 17	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11.
	Id. de Sec. Nº: 18	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11.
	Id. de Sec. Nº: 19	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11.
50	Id. de Sec. Nº: 20	CDR3 de la cadena ligera de, hMab 2F11-c11.
	Id. de Sec. Nº: 21	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11.
	Id. de Sec. Nº: 22	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11.
	Id. de Sec. Nº: 23	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-c11.
	Id. de Sec. Nº: 24	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-c11.
55	Id. de Sec. Nº: 25	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8.
	Id. de Sec. Nº: 26	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8.
	Id. de Sec. Nº: 27	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8.
	Id. de Sec. Nº: 28	CDR3 de la cadena ligera de, hMab 2F11-d8.
	Id. de Sec. Nº: 29	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8.
60	Id. de Sec. Nº: 30	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8.
	Id. de Sec. Nº: 31	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-d8.
	Id. de Sec. Nº: 32	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-d8.
	Id. de Sec. Nº: 33	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7.
	Id. de Sec. Nº: 34	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7.
65	Id. de Sec. Nº: 35	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7.
	Id. de Sec. Nº: 36	CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7.

	Id. de Sec. Nº: 37	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7.
	Id. de Sec. Nº: 38	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7.
	Id. de Sec. Nº: 39	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-e7.
	Id. de Sec. Nº: 40	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-e7.
5	Id. de Sec. Nº: 41	CDR3 de cadena pesada, hMab 2F11-f12.
	Id. de Sec. Nº: 42	CDR2 de cadena pesada, hMab 2F11-f12.
	Id. de Sec. Nº: 43	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12.
	Id. de Sec. Nº: 44	CDR3 de la cadena ligera de, hMab 2F11-f12.
	Id. de Sec. Nº: 45	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12.
10	Id. de Sec. Nº: 46	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12.
	Id. de Sec. Nº: 47	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-f12.
	Id. de Sec. Nº: 48	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-f12.
	Id. de Sec. Nº: 49	CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1.
	Id. de Sec. Nº: 50	CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1.
15	Id. de Sec. Nº: 51	CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1.
	Id. de Sec. Nº: 52	CDR3 de la cadena ligera de, hMab 2F11-g1.
	Id. de Sec. Nº: 53	CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1.
	Id. de Sec. Nº: 54	CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1.
	Id. de Sec. Nº: 55	dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-g1.
20	Id. de Sec. Nº: 56	dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-g1.
	Id. de Sec. Nº: 57	región constante de la cadena ligera kappa humana.
	Id. de Sec. Nº: 58	región constante de la cadena pesada humana derivada de IgG1
	Id. de Sec. Nº: 59	región constante de la cadena pesada derivada de IgG1 humana mutada en L234A y L235A
25	Id. de Sec. Nº: 60	región constante de la cadena pesada derivada de IgG4 humana
	Id. de Sec. Nº: 61	región constante de la cadena pesada derivada de IgG4 humana mutada en S228P
	Id. de Sec. Nº: 62	CSF-1R de tipo salvaje humano (CSF-1R wt)
	Id. de Sec. Nº: 63	CSF-1R humana mutante L301S Y969F
	Id. de Sec. Nº: 64	dominio extracelular de CSF-1R humano
30	Id. de Sec. Nº: 65	fragmento delD4 de CSF-1R humano
	Id. de Sec. Nº: 66	fragmento D1-D3 de CSF-1R humano
	Id. de Sec. Nº: 67	péptido señal.
	Id. de Sec. Nº: 68	cebador
	Id. de Sec. Nº: 69	CDR3 de la cadena pesada, Mab 1G10
35	Id. de Sec. Nº: 70	CDR2 de la cadena pesada, Mab 1G10
	Id. de Sec. Nº: 71	CDR1 de la cadena pesada, Mab 1G10
	Id. de Sec. Nº: 72	CDR3 de la cadena ligera de, Mab 1G10
	Id. de Sec. Nº: 73	CDR2 de la cadena ligera, Mab 1G10
	Id. de Sec. Nº: 74	CDR1 de la cadena ligera, Mab 1G10
40	Id. de Sec. Nº: 75	dominio variable de la cadena pesada, Mab 1G10
	Id. de Sec. Nº: 76	dominio variable de la cadena ligera, Mab 1G10
	Id. de Sec. Nº: 77	CDR3 de cadena pesada, Mab 2H7
	Id. de Sec. Nº: 78	CDR2 de cadena pesada, Mab 2H7
	Id. de Sec. Nº: 79	CDR1 de la cadena pesada, Mab 2H7
45	Id. de Sec. Nº: 80	CDR3 de la cadena ligera de, Mab 2H7
	Id. de Sec. Nº: 81	CDR2 de la cadena ligera, Mab 2H7
	Id. de Sec. Nº: 82	CDR1 de la cadena ligera, Mab 2H7
	Id. de Sec. Nº: 83	dominio variable de la cadena pesada, Mab 2H7
50	Id. de Sec. Nº: 84	dominio variable de la cadena ligera, Mab 2H7

Descripción de las figuras

Figura 1 Inhibición del crecimiento de células tumorales BeWo en cultivo 3D bajo tratamiento con diferentes anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R a una concentración de 10 µg/ml.

55 Eje X: unidades de luz relativa normalizadas (RLU) de la viabilidad media correspondientes al contenido de ATP de las células (ensayo CellTiterGlo).
Eje Y: sondas utilizadas: Medio mínimo (0,5% de SFB), IgG1 murino (mIgG1, 10 µg/ml), ratón IgG2a (mIgG2a 10 µg/ml), CSF-1 solamente, Mab 2F11, Mab 2E10, Mab2H7, Mab1G10 y SC 2-4A5. La inhibición más alta de crecimiento inducida por CSF-1 se observó con los anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención.

60

Figura 2a Sensograma Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 de CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (Id. de Sec. Nº: 65) (eje y: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje x: tiempo en segundos (s)): Si bien los anticuerpos Mab 3291 y sc 2-4A5 muestran claramente la unión a este fragmento delD4, los anticuerpos de acuerdo con la invención por ejemplo, Mab 2F11, y Mab 2E10, no se unen al

65

fragmento delD4 de CSF-1R. El anticuerpo de control anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento delD4 de CSF-1R.

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

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

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

20 Figura 2e Sensograma Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento delD4 de CSF-1R humano inmovilizado (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (Id. de Sec. N°: 65) (eje y: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje x: tiempo en segundos (s)): todos los anticuerpos anti-CSF-1R, 1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 muestran unión al fragmento delD4 de CSF-1R. El anticuerpo de control anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 tampoco se unió al fragmento delD4 de CSF-1R.

25 Figura 2f Sensograma Biacore de unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R al dominio extracelular de CSF-1R humano inmovilizado (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (Id. de Sec. N°: 64) (eje y: señal de unión en unidades de respuesta (RU), línea de base = 0 RU, eje x: tiempo en segundos (s)): Todos los anticuerpos anti-CSF-1R, 1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 muestran unión a CSF-1R-ECD. El anticuerpo de control anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 no se unió a CSF-1R-ECD.

30 Figura 3a-d Niveles de CSF-1 en mono Cynomolgus después de la aplicación de diferentes dosis de anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la invención

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

Ejemplo 1

40 Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-CSF-1R

45 Procedimiento de inmunización de ratones NMRI

Los ratones NMRI se inmunizaron con un vector de expresión pDisplay™ (Invitrogen, EE.UU.) que codifica el dominio extracelular de huCSF-1R mediante la utilización de electroporación. Cada ratón se inmunizó 4 veces con 100 µg de DNA. Cuando se encontraron títulos séricos suficientes de anti-huCSF-1R, los ratones se reforzaron adicionalmente una vez con 50 µg de una mezcla 1:1 huCSF-1R ECD/ quimera huCSF-1R ECDhuFc en 200 µl de PBS por vía intravenosa (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

50 ELISA específico de antígeno

55 Los títulos de anti-CSF-1R en los sueros de los ratones inmunizados se determinaron mediante un ELISA específico de antígeno.

60 Se capturaron 0,3 µg/ml de quimera huCSF-1R-huFc (dominio extracelular soluble) en una placa de estreptavidina (Maxisorb; MicroCoat, DE, n° Cat. 11974998/MC1099) con 0,1 mg/ml de anti Fc gamma biotinilado (Jackson ImmunoResearch, n° cat. 109-066-098) y se añadió F(ab')₂ de IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Healthcare, Reino Unido, n° Cat. NA9310V) diluido 1/800 en PBS/ Tween 20 al 0,05%/ BSA al 0,5%. Los sueros de todos los inyectados se diluyeron 1/40 en PBS/ Tween 20 al 0,05%/ BSA al 0,5% y se diluyó en serie hasta 1/1638400. Los sueros diluidos se añadieron a los pocillos. EL suero pre-inyección se utilizó como control negativo. Se utilizó una serie de diluciones del Mab3291 anti-CSF-1R humano de ratón (R&D Systems, UK) a partir de 500 ng/ml hasta 0,25 ng/ml como control positivo. Todos los componentes se incubaron juntos durante 1,5

horas, los pocillos se lavaron 6 veces con PBST (PBS/ Tween 20 al 0,2%) y los ensayos se revelaron con solución ABTS® recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) durante 10 minutos a TA. La absorbancia se midió a 405 nm.

5 Generación de hibridomas

Los linfocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con una línea celular de mieloma de ratón utilizando protocolos estándar basados en PEG para generar hibridomas. Los hibridomas resultantes se criban entonces para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, las suspensiones de células individuales de linfocitos derivados del bazo a partir de ratones inmunizados se fusionan con células de mieloma de ratón no secretoras de Ag8 P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL-1580) con PEG al 50%. Las células se sembraron en placas a un título de aproximadamente 10^4 en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, seguido de alrededor de dos semanas de incubación en medio selectivo. Los pocillos individuales se cribaron en busca de anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-CSF-1R humanos mediante ELISA. Una vez que se da el crecimiento extensivo del hibridoma, los hibridomas secretores de anticuerpos se replaquean, se criban otra vez, y si siguen dando positivo para los anticuerpos IgG monoclonales anti-CSF-1R humanos, puede subclonarse mediante FACS. Los subclones estables se cultivan a continuación *in vitro* para producir anticuerpos en el medio de cultivo tisular para su caracterización. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden seleccionarse usando la determinación de la unión de los anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento del D4 del CSF-1R humano y al dominio extracelular de CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) como se describe en el Ejemplo 4, así como la determinación de la inhibición del crecimiento de células NIH3T3 transfectadas con CSF-1R salvaje (señalización dependiente de ligando) o CSF-1R mutante L301S Y969F (señalización independiente de ligando) bajo tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R como se describe en el Ejemplo 5.

25 Cultivo de los hibridomas

Los hibridomas muMAb generados se cultivaron en medio RPMI 1640 (PAN – N° Catálogo (N° Cat.) PO4-17500) suplementado con L-glutamina 2 mM (GIBCO - N° Cat. 35050-038), Na-Piruvato 1 mM (GIBCO - N° Cat. 11360-039), 1x NEAA (GIBCO - N° Cat. 11140-035), FCS al 10% (PAA - N° Cat. A15-649), 1x Pen Strep (Roche - N° Cat. 1074440), 1x Nutridoma CS (Roche - N° Cat. 1363743), mercaptoetanol 50 μ M (GIBCO - N° Cat. 31350-010) y 50 U/ml de IL 6 de ratón (Roche - N° Cat. 1 444 581) a 37°C y 5% de CO₂. Algunos de los anticuerpos de ratón resultantes se han humanizado (por ejemplo el Mab 2F11) y se ha expresado de forma recombinante.

35 Ejemplo 2

Inhibición de la unión de CSF-1 a CSF-1R (ELISA)

Al establecer este ensayo de forma que primero permite la unión del anticuerpo anti-CSF-1R al CSF-1R-ECD seguido por la detección de ligando no unido al receptor, tanto pueden analizarse los anticuerpos que desplazan el ligando como los anticuerpos anti-CSF-1R que inhiben la dimerización. La prueba se realizó en placas de microtitulación de 384 pocillos (MicroCoat, DE, N° cat. 464718) a TA. Después de cada paso de incubación las placas se lavaron 3 veces con PBST.

Al principio, las placas se recubrieron con 0,5 mg/ml de F(ab')₂ de anti-Fc gamma biotinilado de cabra (Jackson ImmunoResearch., N° Cat. 109-006-170) durante 1 hora (h).

A continuación, los pocillos se bloquearon con PBS suplementado con Tween®-20 al 0,2% y BSA al 2% (Roche Diagnostics GmbH, DE) durante 0,5 h. Se inmovilizaron 75 ng/ml de quimera huCSF-1R-huFc (que forma el dominio extracelular soluble dimerico de huCSF-1R) a la placa durante 1 h. Entonces se incubaron diluciones de los anticuerpos purificados en PBS/Tween 20 al 0,05%/ BSA al 0,5% durante 1 h. Después de añadir una mezcla de CSF-1 3 ng/ml (Biomol, DE, N° Cat. 60530), clon BAF216 anti-CSF-1 biotinilado 50 ng/ml (R&D Systems, UK) y estreptavidina HRP diluida 1:5000 (Roche Diagnostics GmbH, DE, N° Cat. 11089153001) durante 1 h, las placas se lavaron 6 veces con PBST. Como control positivo se utilizó el anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US) que inhibe la interacción de receptor y ligando. Las placas se revelaron con una solución de sustrato POD BM Blue® recién preparada (BM Blue®: 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina, Roche Diagnostics GmbH, DE, N° Cat. 11484281001) durante 30 minutos a TA. Se midió la absorbancia a 370 nm. Se encuentra una disminución de la absorbancia si el anticuerpo anti-CSF-1R provoca la liberación de CSF-1 del complejo dimerico. Todos los anticuerpos anti-CSF-1R mostraron una inhibición significativa de la interacción CSF-1 con CSF-1R (véase la Tabla 1). El anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US, ver también Sherr, CJ et al., Blood 73 (1989) 1786/93), que inhibe la interacción de receptor y ligando, se utilizó como control de referencia.

Tabla 1:

Valores calculados de CI50 para la inhibición de la interacción CSF-1/ CSF-1R	
Mab CSF-1R	CI50 de la inhibición CSF-1/ CSF-1R [ng/ml]
Mab 2F11	19,3
Mab 2E10	20,6
Mab 2H7	18,2
Mab 1G10	11,8
SC 2-4A5	35,2

Ejemplo 3

5

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

4,5 x 10³ células NIH 3T3, infectadas mediante retrovirus con un vector de expresión del CSF-1R de longitud completa, se cultivaron en DMEM (PAA N° Cat. E15-011), L-glutamina 2 mM (Sigma, N° Cat. G7513), 2 mM de piruvato sódico, aminoácidos no esenciales 1x, FKS al 10% (PAA, N° Cat. A15-649) y PenStrep 100 mg/ml (Sigma, N° Cat. P4333 [10 mg/ml]) hasta que alcanzaron la confluencia. A partir de entonces las células se lavaron con medio DMEM libre de suero (PAA N° Cat. E15-011) suplementado con selenito sódico [5 ng/ml] (Sigma, N° Cat. S9133), transferrina [10 µg/ml] (Sigma, N° Cat. T8158), BSA [400 µg/ml] (Roche Diagnostics GmbH, N° Cat. 10735078), L-glutamina 4 mM (Sigma, N° Cat. G7513), piruvato sódico 2 mM (Gibco, N° Cat. 11360), aminoácidos no esenciales 1x (Gibco, Cat. 11140-035), 2-mercaptoetanol [0,05 mM] (Merck, N° Cat. M7522) y PenStrep 100 µg/ml (Sigma, N° Cat. P4333) y se incubaron en 30 µl del mismo medio durante 16 horas para permitir la sobrerregulación del receptor. Se añadieron 10 µl de anticuerpos anti-CSF-1R diluidos a las células durante 1,5 h. Luego, las células se estimularon con 10 µl de HUM-CSF-1 100 ng/ml (Biomol N° Cat. 60530) durante 5 min. Después de la incubación, se retiró el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con 80 µl de PBS enfriado con hielo y se añadieron 50 µl de tampón de lisis enfriado con hielo recién preparado (NaCl 150 mM/ Tris 20 mM pH 7,5/ EDTA 1 mM/ EGTA 1 mM/ Triton X-100 al 1%/1 tableta de inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics GmbH N° Cat. 1 836 170) por 10ml de tampón, cóctel inhibidor de fosfatasa 1 10 µl/ml (Sigma N° Cat. P-2850, Stock 100x), inhibidor de proteasas 1 10 µl/ml (Sigma N° Cat. P-5726, Stock 100x), NaF 1 M 10 µl/ml). Después de 30 minutos en hielo las placas se agitaron vigorosamente en un agitador de placas durante 3 minutos y después se centrifugaron 10 minutos a 2200 rpm (Heraeus Megafuge 10).

La presencia de receptor de CSF-1 fosforilado y total en el lisado celular se analizó mediante Elisa. Para la detección del receptor fosforilado se utilizó el equipo de R&D Systems (N° Cat. DYC3268-2) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para la detección del CSF-1R total se inmovilizaron 10 µl del lisado sobre la placa mediante el uso del anticuerpo de captura que contiene el equipo. Entonces se añadió el anticuerpo BAF329 contra CSF-1R biotinilado diluido 1:750 (R&D Systems) y conjugado estreptavidina-HRP diluido 1:1000. Después de 60 minutos las placas se revelaron con una solución de ABTS® recién preparada y se detectó la absorbancia. Los datos se calcularon como % del control positivo sin anticuerpo y el valor de la razón de receptor expresado fosforilado/ total. El control negativo se definió sin adición de M-CSF-1. Como control de referencia se utilizó el anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU., ver Sherr, CJ et al., Blood 73 (1989) 1786-1793), que inhibe la interacción ligando-receptor.

Tabla 2:

Valores calculados de CI50 para la inhibición de la fosforilación del receptor CSF-1R	
Mab CSF-1R	CI50 de la fosforilación de CSF-1R [ng/ml]
Mab 2F11	219,4
Mab 2E10	752,0
Mab 2H7	703,4
Mab 1G10	56,6
SC 2-4A5	1006,6

Ejemplo 4

40

Determinación de la unión de los anticuerpos anti-CSF-1R al fragmento del D4 del CSF-1R humano y al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD)

Preparación de dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5, HCSF-1R-ECD) de Id. de Sec. N°: 64:

El pCMV-pres-Fc-HCSF-1R-ECD (7836 bp) codifica el ECD completo del CSF-1R humano (Id. de Sec. N°: 64) fusionado en el extremo C-terminal a un sitio de escisión de la proteasa PreScission, seguido por los aa100-330 de la IgG1 humana y una cola 6xHis, bajo el control del promotor de CMV. El péptido señal natural se ha modificado mediante la inserción de los aminoácidos G y S después de la primera M, con el fin de crear un sitio de restricción BamHI.

50

Preparación del fragmento delD4 del CSF-1R humano (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5, hCSF-1R-delD4) del Id. de Sec. N°: 65:

El hCSF1R-delD4-V1-Presc-hFc-His fue clonado a partir del pCMV-pres-Fc-HCSF-1R-ECD mediante el protocolo de mutagénesis dirigida de Stratagene QuikChange XL, utilizando el cebador directo delD4-for con la secuencia CACCTCCATGTTCTTCCGGTACCCCCCAGAGGTAAG (Id. de Sec. N°: 68) y como cebador inverso el delD4-rev con la secuencia inversa complementaria. Una variación del protocolo publicada en BioTechniques 26 (1999) 680 se utilizó para extender ambos cebadores en reacciones separadas en tres ciclos que precedían al protocolo habitual de Stratagene:

Se establecieron dos mezclas de reacción separadas de 50 µl de acuerdo con el manual del fabricante, y cada una de ellas contenía 10 ng de plásmido pCMV-preS-Fc-hCSF1R-ECD como molde y 10 pM de uno de los cebadores delD4-for o delD4-rev y 0,5 µl de la polimerasa de DNA Pfu proporcionada en el equipo. Se realizaron tres ciclos de PCR de 95°C 30 s/ 55°C 60 s/ 68°C 8 min., y a continuación 25 µl de cada una de las mezclas de reacción se combinaron en un nuevo tubo y se añadieron 0,5 µl de polimerasa de DNA Pfu fresca. Se llevó a cabo el protocolo regular de PCR con 18 ciclos de temperatura según lo especificado por Stratagene en el manual del equipo, seguido de 2 horas de digestión final con el enzima de restricción Dpn1 proporcionado con el equipo. Los clones con la delección se detectaron mediante la digestión con Cel II y Not I y se verificaron mediante secuenciación.

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

El fragmento delD4 de CSF-1R humano se obtuvo en dos fracciones como una molécula dimérica (pool1, V = 1,5 ml; c = 0,30 mg/ml, masa aparente en SDS-PAGE 83 kDa, reducido 62 kDa) y como monómero (pool2, V = 1,4 ml; c = 0,25 mg/ml, masa aparente en SDS-PAGE 62 kDa). La forma dimérica se utilizó para todos los experimentos.

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

Instrumento:	Biacore T100 (GE Healthcare)
Programa:	T100 Control, Versión 2.0.1 T100 Evaluación, Versión 2.0.2
Formato de ensayo:	Chip CM5
Temperatura:	25°C

Los fragmentos de CSF-1R se inmovilizaron a través de acoplamiento amina. Para comparar la unión de diferentes anticuerpos anti-CSF-1R de acuerdo con la invención se inyectó una sola concentración del anticuerpo de prueba. Como control de referencia se utilizaron el anti-CSF-1R Mab3291 (R&D Systems) y el SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US, ver también Sherr, CJ et al., Blood 73 (1989) 1786-1793), como control negativo el m<CCR5>Pz03.1C5 anti-CCR5 (depositado como DSM ACC 2683 el 18/08/2004 en DSMZ), todo bajo las mismas condiciones que los anticuerpos anti-CSF-1R de la invención.

Acoplamiento amina de los fragmentos de CSF-1R

Acoplamiento amina estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante: tampón de análisis: PBS-T (Roche: 11 666 789 + Tween 20 al 0,05%: 11 332 465), activación mediante mezcla de EDC/ NHS, inyección del fragmento delD4 de CSF-1R humano (que comprende los subdominios extracelulares D1-D3 y D5) (Id. de Sec. N°: 65) y el dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1-D5) (Id de Sec. N°: 64) durante 600 segundos a una velocidad de flujo de 10 µl/min; diluido en tampón de acoplamiento de NaAc, pH 5,0, c = 10 µg/mL; los grupos carboxilo activados restantes al final se bloquearon mediante la inyección de etanolamina 1 M.

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

Tampón de análisis: PBS-T (Roche: 11 666 789 + Tween 20 al 0,05%: 11 332 465)

Muestra de analito:

La unión se midió a una velocidad de flujo de 30 µL/ min mediante una inyección de analito a una concentración de c= 10 nM (para el Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab humanizado 2F11-e7 en un segundo experimento). Cada inyección fue de 700 segundos de duración, seguidos de una fase de disociación de 180 segundos. La regeneración final se llevó a cabo después de cada ciclo usando NaOH 50 mM, con un tiempo de contacto de 60 segundos y una velocidad de flujo de 30 µl/ min.

Las señales se midieron mediante un punto de informe 10 segundos posterior al final de la inyección. Las señales de referencia (señales de una célula de flujo de referencia de blanco (tratada con EDC/ NHS y etanolamina, solamente) se restaron para dar lugar a las señales de unión (como RU). Si las señales de unión de los anticuerpos que no se unen eran ligeramente inferior a 0 (Mab 2F11= -3, Mab 2E10= -2, Mab 1G10= -6, Mab 2H7= -9 y hMab humanizado 2F11-e7= -7) los valores se establecieron en 0.

Tabla 3a:

Unión de los MAb <CSF-1R> al fragmento delD4 de CSF-1R humano y a CSF-1R-ECD y la relación a 25°C, medida por SPR			
	Unión a delD4 [RU]	Unión a CSF-1R-ECD [RU]	Proporción de unión de los anticuerpos anti-CSF1R a fragmento delD4 de CSF1R / CSF-1R-ECD
Mab 3291	1015	627	1015/627 = 1,61
sc2-4A5	374	249	374/249 = 1,50
Mab 2F11	0	176	0/176 = 0
hMab 2F11-e7	0	237	0/237 = 0
Mab 2E10	0	120	0/120 = 0
Mab 1G10	0	2708	0/2708 = 0
Mab 2H7	0	147	0/147 = 0
m<CCR5>Pz03.1C5	2	5	-

El Mab 2F11 y el Mab 2E10 mostraron unión al dominio extracelular del CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (ver figura 2b), sin embargo, no se detectó unión al fragmento delD4 de CSF-1R (ver Fig. 2a).

Sc2-4A5 y MAB3291 mostraron unión a CSF-1R-ECD y a delD4 (véase las Figs. 2b y 2a).

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

Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab humanizado 2F11-e7 mostraron unión al dominio extracelular de CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (ver la figura 2d), sin embargo, no se detectó unión al fragmento delD4 de CSF-1R (véase la Fig. 2c). Así, la relación de unión de los anticuerpos anti-CSF1R Mab 1G10, Mab 2H7 y hMab humanizado 2F11-E7 al fragmento delD4 de CSF1R/ a CSF-1R-ECD era claramente inferior a 1:50 (= 0,02).

En un experimento posterior, se investigaron los anticuerpos anti-CSF-1R 1.2.SM (anticuerpo CSF-1R que desplaza el ligando descrito en la WO 2009026303), CXIIG6 (anticuerpo CSF-1R que desplaza el ligando descrito en el documento WO 2009/112245) y el anticuerpo anti-CSF-1R policlonal de cabra ab10676 (Abcam). Se utilizó el anticuerpo anti-CSF-1R Mab3291 (R & D-Systems) como control de referencia. Se utilizó como control negativo el anti-CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (depositado como DSM ACC 2683 en 08.18.2004 en DSMZ).

Tabla 3b:

Unión de los MAb <CSF-1R> al fragmento delD4 de CSF-1R humano y a CSF-1R-ECD y la relación a 25°C, medida por SPR			
	Unión a delD4 [RU]	Unión a CSF-1R-ECD [RU]	Proporción de unión de los anticuerpos anti-CSF1R a fragmento delD4 de CSF1R / a CSF-1R-ECD
Mab 3291	1790	1222	1790 / 1222 = 1,47
1.2.SM	469	704	469 / 704 = 0,67
CXIIG6	1983	1356	1983 / 1356 = 1,46
ab10676	787	547	787 / 547 = 1,44
m<CCR5>Pz03.1C5	0	0	-

1.2.SM, CXIIG6, ab10676 y MAB3291 mostraron unión a CSF-1R-ECD y a del D4 (ver Fig. 2f y 2e).

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

Ejemplo 5

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

5 Las células NIH 3T3, infectadas con retrovirus o bien con un vector de expresión con el CSF-1R de tipo salvaje de longitud completa (Id. de Sec. N°: 62) o CSF-1R L301S Y969F mutante (Id. de Sec. N°: 63), se cultivaron en medio DMEM con elevada glucosa (PAA, Pasching, Austria) suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 2 mM y aminoácidos no esenciales y suero bovino fetal al 10% (Sigma, Taufkirchen, Alemania) en placas recubiertas de poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) (Polysciences, Warrington, PA, EE.UU.), para evitar la adherencia a la superficie plástica. Las células se sembraron en un medio que sustituye el suero por selenito de sodio 5 ng/ml, transferrina 10 mg/ml, BSA 400 µg/ml y 2-mercaptoetanol 0,05 mM. Cuando se trató con 100 ng/ml de huCSF-1 (Biomol, Hamburgo, Alemania), las células que expresaban wtCSF-1R formaron esferoides densos que crecieron en tres dimensiones, una propiedad que se llama independencia de anclaje. Estos esferoides se parecen mucho a la arquitectura tridimensional y organización de los tumores sólidos *in situ*. Las células recombinantes con CSF-1R mutante son capaces de formar esferoides independientemente del ligando CSF-1. Los cultivos de esferoides se incubaron durante 3 días en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo con el fin de determinar una CI_{50} (concentración una inhibición del 50 por ciento de la viabilidad celular). El ensayo CellTiterGlo se utilizó para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células.

Tabla 5a:

Mab CSF-1R	CI_{50} wtCSF-1R [µg/ml]	CI_{50} CSF-1R Mutante [µg/ml]
Mab 2F11	1,1	8,0
Mab 2E10	0,49	4,9
Mab 2H7	0,31	5,3
Mab 1G10	0,29	14,2
SC 2-4A5	10,0	10,0

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

25 En un experimento adicional, se investigaron el anticuerpo anti-CSF-1R de acuerdo con la invención hMAb 2F11-e7 y los anticuerpos anti-CSF1R 1.2.SM (anticuerpo CSF-1R con desplazamiento de ligando descrito en la WO 2009026303), CXIIG6 (anticuerpo CSF-1R con desplazamiento de ligando descrito en el documento WO 2009/112245), el anticuerpo anti-CSF-1R policlonal de cabra ab10676 (Abcam) y SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, US, véase también Sherr, CJ et al., Blood 73 (1989) 1786-1793).

30 Los cultivos de esferoides se incubaron durante 3 días en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo con el fin de determinar una CI_{30} (concentración con una inhibición del 30 por ciento de la viabilidad celular). La concentración máxima fue de 20 µg/ml. El ensayo CellTiterGlo se utilizó para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células.

Tabla 5b:

Mab CSF-1R	CI_{30} wtCSF-1R [µg/ml]	CI_{30} CSF-1R Mutante [µg/ml]
Mab 2F11-e7	4,91	0,54
1.2.SM	1,19	> 20 µg/ml (inhibición de -19% a 20 µg/ml = 19% de estimulación)
CXIIG6	> 20 µg/ml (inhibición de 21% a 20 µg/ml)	> 20 µg/ml (inhibición de -36% a 20 µg/ml = 36% de estimulación)
ab10676	14,15	> 20 µg/ml (inhibición 0% a 20 µg/ml)
SC 2-4A5	16,62	2,56

35 Ejemplo 6

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

40 Las células de coriocarcinoma BeWo (ATCC CCL-98) se cultivaron en medio F12K (Sigma, Steinheim, Alemania) suplementado con FBS al 10% (Sigma) y L-glutamina 2 mM. Se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas recubiertas de poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) de 96 pocillos que contenían medio F12K suplementado con FBS al 0,5% y BSA al 5%. Al mismo tiempo, se añadieron huCSF-1 200 ng/ml y 10 µg/ml de los diferentes anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R, y se incubaron durante 6 días. El ensayo CellTiterGlo se utilizó para detectar la viabilidad celular midiendo el contenido de ATP de las células en unidades relativas de luz (RLU). Cuando los cultivos esferoides de BeWo se trataron con los diferentes anticuerpos anti-CSF-1R (10 µg/ml) se observó inhibición del crecimiento inducido por CSF-1. Para calcular la inhibición mediada por los anticuerpos se restó de todas las muestras el valor medio de RLU de las células BeWo no estimuladas. El valor promedio de RLU

de las células estimuladas con CSF-1 se fijó arbitrariamente al 100%. Los valores promedios de RLU de las células estimuladas con CSF-1 y tratadas con anticuerpos anti-CSF-1R se calcularon en % de RLU de las estimuladas con CSF-1. La Tabla 6 muestra los datos calculados de la inhibición del crecimiento de las células tumorales BeWo en cultivo 3D bajo tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R; las Figs.1a y b representan los valores promedio normalizados de RLU.

Tabla 6:

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

Ejemplo 7

10 Inhibición de la diferenciación de los macrófagos humanos bajo tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo Cell-TiterGlo)

Los monocitos humanos se aislaron a partir de sangre periférica usando el cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep™ (StemCell Tech. N° Cat. 15028). Las poblaciones de monocitos enriquecidos se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos (2,5 x 10⁴ células/pocillo) en 100 µl de RPMI 1640 (Gibco. N° Cat. 31870) suplementado con FCS al 10% (GIBCO N° Cat. 011-090014M), L-glutamina 4 mM (GIBCO N° Cat. 25030) y PenStrep 1x a 37°C y al 5% de CO₂ en una atmósfera húmeda (Roche N° Cat.1 074 440). Cuando se añadieron 150 ng/ml de huCSF-1 al medio, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos adherentes. Esta diferenciación pudo inhibirse mediante la adición de anticuerpos anti-CSF-1R. Además, la supervivencia de los monocitos se ve afectada y podría analizarse mediante el análisis CellTiterGlo (CTG). A partir de la inhibición dependiente de concentración de la supervivencia de los monocitos mediante el tratamiento con anticuerpos, se calculó una Cl₅₀ (véase la Tabla 7).

Tabla 7:

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

25 En una serie de pruebas separadas, versiones humanizadas de Mab 2 F11, por ejemplo, hMAb 2F11-c11, hMAb 2F11-d8, hMAb 2F11- e7, hMAb 2F11-f12, mostraron valores de Cl₅₀ de 0,07 µg/ml (hMAb 2F11-c11), 0,07 µg/ml (HMAb 2F11-d8), 0,04 µg/ml (HMAb 2F11-e7) y 0,09 µg/ml (HMAb 2F11-f12).

Ejemplo 8

30 Inhibición de la diferenciación de los macrófagos de cynomolgus bajo tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CSF-1R (ensayo CellTiterGlo)

Los monocitos de cynomolgus se aislaron de sangre periférica utilizando el equipo para primate no humano de microcuentas CD 14 (Miltenyi Biotec - N° Cat. 130-091-097) de acuerdo con la descripción del fabricante. Las poblaciones de monocitos enriquecidos se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos (1-3 x 10⁴ células/pocillo) en 100 µl RPMI 1640 (Gibco – N° Cat.31870) suplementado con FCS al 10% (GIBCO – N° Cat. 011-090014M), L-glutamina 4 mM (GIBCO – N° Cat. 25030) y PenStrep 1x (Roche N° Cat.1 074 440) a 37°C y un 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. Cuando se añadieron 150 ng/ml de huCSF-1 al medio, se pudo observar una clara diferenciación en macrófagos adherentes. Esta diferenciación pudo inhibirse mediante la adición de anticuerpos anti-CSF-1R. Además, la supervivencia de los monocitos se ve afectada y pudo analizarse por el análisis CellTiterGlo (CTG). La viabilidad se analizó a una concentración de 5 µg/ml de anticuerpo de tratamiento (véase la Tabla 8).

Tabla 8:

Mab CSF-1R	% de supervivencia	% de inhibición (de la supervivencia) = (100% -% de supervivencia)
Mab 2F11	4 *	96
Mab 2E10	17 **	83
Mab 2H7	8	92

Mab CSF-1R	% de supervivencia	% de inhibición (de la supervivencia) = (100% -% de supervivencia)
Mab 1G10	2	98
SC 2-4A5	31	69
* media de cuatro experimentos (3 expts. utilizando el mAb murino, 1 expt. utilizando el quimérico)		
** media de dos experimentos utilizando solo el mAb murino		

Ejemplo 9

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

Instrumento: BIAcore® A100
 Chip: CM5 (Biacore BR-1006/68)
 Acoplamiento: acoplamiento amina
 Buffer: PBS (Biacore BR-1006/72), pH 7,4, 35°C

Para las mediciones de afinidad, 36 µg/ml de anticuerpos anti-Fc gamma de ratón (de cabra, Jackson Immuno Research JIR115-005-071) se han acoplado a la superficie del chip para la captura de los anticuerpos contra CSF-1R. El dominio extracelular de CSF-1R humano (CSF-1R-ECD) (que comprende los subdominios extracelulares D1 - D5) (Id. de Sec. Nº: 64) (R & D-Systems 329-MR o pCMV-presS-HisAvitag-hCSF-1R-ECD subclonado) se añadió en varias concentraciones en solución. La asociación se midió mediante una inyección de CSF-1R de 1,5 minutos a 35°C; la disociación se midió mediante el lavado de la superficie del chip con tampón durante 10 minutos a 35°C. Para el cálculo de los parámetros cinéticos se utilizó el modelo 1:1 de Langmuir.

Tabla 9:

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

En un ensayo separado de unión BIAcore usando el CSF-1R ECD (datos no mostrados) se detectó cierta competencia de los anticuerpos Mab 2F11 y Mab 2E10 con el anticuerpo Ab SC-2-4A5. Sin embargo Mab 2F11 / Mab 2E10 no se unen al fragmento delD4 de CSF-1R humano, mientras que el Ab SC-2-4A5 se une a este fragmento delD4 (véase el Ejemplo 4 y la figura 2a). Así, la región de unión de Mab 2F11 / Mab 2E10 es claramente distinta de la región de unión de Ab SC-2-4A5, pero probablemente se sitúa en una zona vecina. En tal ensayo de competición ambos anticuerpos Mab 2F11 y Mab 2E10 no competían con Mab3291 de R&D Systems (datos no mostrados).

Ejemplo 10

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

Instrumento: Biacore T100 (GE Healthcare)
 Software: Control T100, Versión 1.1.11
 B3000 Evaluation, Versión 4.01
 Scrubber, Versión 2.0a

Formato de ensayo: Chip: CM5-Chip

Los anticuerpos contra CSF-1R fueron capturados a través de moléculas de captura de acoplamiento amina. El uso de la cinética de ciclo individual, se inyectaron cinco concentraciones crecientes de fragmento D1-D3 del CSF-1R humano (Id. de Sec. Nº: 66). El fragmento D1-D3 de CSF-1R humano se subclonó en el vector de expresión pCMV-presS-HisAvitag.

Como controles de referencia se utilizaron el anti-CSF-1R SC 2-4A5 (Santa Cruz Biotechnology, EEUU; Sherr, CJ et al., Blood 73 (1989) 1786-1793), que inhibe la interacción ligando-receptor, y el Mab 3291 (R&D Systems).

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

Acoplamiento amina de las moléculas de captura

Acoplamiento de amina estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante: tampón de análisis: tampón HBS-N, activación mediante la mezcla de EDC/NHS, objetivo de densidad del ligando de 2000 RU; Abs de captura diluidos en tampón de acoplamiento NaAc, pH 4,5, c = 10 µg/mL; los grupos carboxilo activados restantes al final se bloquearon mediante inyección de etanolamina 1 M.

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

Tampón de análisis: PBS (Biacore BR-1006/72)

10 Captura de los Mab <CSF-1R> en células de flujo de 2 a 4: flujo de 20 µL/min, tiempo de contacto 90 segundos, C(Abs <CSF-1R>) = 50 nM, dilución con tampón + BSA 1 mg/ml;

Muestra de analito:

15 Se midió la cinética de un solo ciclo a una velocidad de flujo de 30 µL/min mediante cinco inyecciones consecutivas de analito con concentraciones c = 7,8, 31,25, 125, 500 y 2000 nM, sin regeneración. Cada inyección fue de 30 segundos de duración y fue seguida de una fase de disociación de 120 segundos durante las primeras cuatro inyecciones, y finalmente 1200 segundos para la concentración más alta (= última inyección).

20 La regeneración final se realizó después de cada ciclo usando glicina 10 mM pH 1,5 (Biacore BR-1003-54), tiempo de contacto 60 segundos, tasa de flujo 30 µl/min.

25 Los parámetros cinéticos se calcularon mediante el uso de la doble referenciación habitual (control de referencia: unión del analito a la molécula de captura; célula de flujo: concentración "0" del subdominio CSF-1R como blanco) y cálculo con el modelo de cinética de titulación de la unión 1:1 con dosis.

Tabla 10:

Datos de afinidad para la unión del fragmento D1-D3 de CSF-1R humano medida por SPR						
Mab CSF-1R	Subdominio	K _D (nM)	k _a (1 / Ms)	k _d (1 / s)	T _{1/2} (min)	
Mab 2F11	D1-D3	sin unión				
Mab 2E10	D1-D3	sin unión				
Mab 2H7	D1-D3	no determinado				
Mab 1G10	D1-D3	sin unión				
SC-2-4A5	D1-D3	sin unión				
R&D Systems 3291	D1-D3	5,4	2,2E ⁺⁵	1,2E ⁻³	9,6	

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

Tampoco se unió el anticuerpo de control de referencia SC-2-4A5 al fragmento D1-D3 de CSF-1R humano.

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

Ejemplo 11

Aumento del nivel de CSF-1 durante la inhibición de CSF-1R en mono Cynomolgus

40 Los niveles en suero de CSF-1 proporcionan un marcador farmacodinámico de actividad neutralizante de CSF-1R del inhibidor de la dimerización hMAb 2F11-e7 anti-CSF-1R humano. Se administraron por vía intravenosa a un macho y una hembra de mono cynomolgus por grupo de dosificación (1 y 10 mg/kg) anticuerpo hMAb 2F11-e7 anti-CSF-1R. Las muestras de sangre para el análisis de los niveles de CSF-1 se recogieron 1 semana antes del tratamiento (pre-dosis), 2, 24, 48, 72, 96, 168 horas después de la dosis y semanalmente durante dos semanas adicionales. Se determinaron los niveles de CSF-1 utilizando un equipo ELISA disponible comercialmente (Quantikine® M-CSF humano) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Reino Unido). El nivel de CSF-1 en monos se determinó por comparación con muestras de de curva estándar de CSF-1 proporcionados en el equipo.

50 La administración de hMAb 2F11-e7 indujo un aumento dramático en CSF-1 de ~ 1000 veces, que dependiendo de la dosis administrada se prolongó durante 48 h (1 mg/kg) o 15 días (10 mg/kg). Por lo tanto, un inhibidor de la dimerización de CSF-1R ofrece la ventaja de no competir directamente con el ligando dramáticamente sobrerregulado por la unión al receptor en contraste con un anticuerpo que desplaza el ligando.

55 Ejemplo 12

Eficacia in vivo - inhibición del crecimiento tumoral de los anticuerpos anti-CSF-1R en las células tumorales de xenoinjerto de cáncer de mama BT20 en ratones SCID de color beige

5 La línea celular de cáncer de mama humano BT-20 expresa CSF-1R humano, pero carece de expresión de CSF-1 (Sapi, E. et al., Cancer Res 59 (1999) 5578-5585). Debido a que el CSF-1 murino no activa CSF-1R humano en las células del tumor, se complementó CSF-1 recombinante humano (Biomol, Hamburgo, Alemania) mediante minibombas osmóticas (Alzet, Cupertino, CA) proporcionando una tasa de infusión continua de CSF-1 de 2 µg/día (Martin, TA, Carcinogenesis 24 (2003) 1317-1323).

10 Para comparar directamente la eficacia de un anticuerpo que interfiere con la dimerización de CSF-1R con un anticuerpo que desplaza el ligando de CSF-1R hemos probado el Mab 2F11 quimérico anti-CSF-1R (el anticuerpo interfiere con la dimerización de CSF-1R) y 1.2.SM (anticuerpo que desplaza el ligando de CSF-1R descrito en WO2009026303) en el modelo de xenoinjerto BT-20.

15 Los ratones SCID de color beige (Charles River, Sulzfeld, Alemania) se coinyectaron por vía subcutánea con 1×10^7 células BT-20 (ATCC HTB-19) y 100 µl de Matrigel. El tratamiento de los animales comenzó el día de la aleatorización a un volumen tumoral medio de 100 mm³. Los ratones se trataron por vía intraperitoneal, una vez por semana con los correspondientes anticuerpos (véase la figura 4) en 20 mM de histidina, 140 mM NaCl, pH 6,0. Las dimensiones tumorales se midieron con un pie de rey comenzando el día de estadiaje y posteriormente 2 veces por semana durante todo el período de tratamiento. El volumen del tumor se calculó de acuerdo con el protocolo del NCI (peso del tumor = $1/2ab^2$, donde "a" y "b" son los diámetros largos y cortos del tumor, respectivamente).

25 El análisis del crecimiento del tumor se muestra en la Figura 4. La inhibición de CSF-1R humano en las células tumorales con el Mab 2F11 quimérico anti-CSF-1R fue estadísticamente más eficaz en la mediación de la inhibición del crecimiento tumoral que el anticuerpo 1.2.SM anti-CSF-1R (el anticuerpo CSF-1R se describe en WO2009026303).

Listado de secuencias

30 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Anticuerpos contra CSF-1R humano y la utilización de los mismos
 <130> 26143 WO
 <150> EP09015310
 <151> 2009-12-10
 35 <150> EP10173407
 <151> 2010-08-19
 <160> 84
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 40 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 1

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

45 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 50 <400> 2

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

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 55 <213> Mus musculus
 <400> 3

Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

60 <210> 4
 <211> 8

ES 2 557 454 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

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

15

20

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

25

<210> 8
 <211> 106

ES 2 557 454 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8

```

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

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

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

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

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

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

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

5
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 9

```

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp
1           5
  
```

15
 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10

```

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

20
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11

```

Ser Phe Asp Ile Ser
1           5
  
```

25
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 12

```

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
1           5
  
```

30
 <210> 13

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 13

5
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 14

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 15
 <211> 116
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser

115

<210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus
 <400> 16

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 17

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

10 <210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-c11

<400> 18

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

<210> 19

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 19

Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

25 <210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

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

<400> 20

ES 2 557 454 T3

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

5 <210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11
<400> 21

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

10 <210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
15 <220>
<223> CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-c11
<400> 22

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

20 <210> 23
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
25 <223> dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-c11
<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

ES 2 557 454 T3

<211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

5 <223> dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-c11
 <400> 24

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8
 <400> 25

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

15 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

20 <223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8
 <400> 26

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

25 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

30 <223> CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-d8
 <400> 27

ES 2 557 454 T3

Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

5 <210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
<400> 28

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

10 <210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
15 <223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
<400> 29

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

20 <210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
<400> 30

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

25 <210> 31
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-d8
<400> 31

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser

115

- <210> 32
- <211> 106
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-d8
- <400> 32

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
 <400> 33

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

10 <210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
 <400> 34

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

<210> 35
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
 <400> 35

Ser Tyr Asp Ile Ser
 1 5

25 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>

ES 2 557 454 T3

<223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
 <400> 36

Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

5 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
 <400> 37

Ala Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

15 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
 <400> 38

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

20 <210> 39
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

25 <223> dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-e7
 <400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 557 454 T3

5 <210> 40
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-e7
 <400> 40

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
 <400> 41

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

20 <210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
 <400> 42

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

25 <210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
 <400> 43

Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

ES 2 557 454 T3

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
 <400> 44

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

10 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
 <400> 45

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

20 <210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
 <400> 46

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

25 <210> 47
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-f12
 <400> 47

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

Thr Val Ser Ser 115

- <210> 48
- <211> 106
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-f12
- <400> 48

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

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

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

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

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

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

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

- 10
- <210> 49
- <211> 8
- 15 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> CDR3 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
- <400> 49

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

- 20 <210> 50
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> CDR2 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
- <400> 50

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

- 30 <210> 51
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> CDR1 de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
- <400> 51

ES 2 557 454 T3

Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

5 <210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> CDR3 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
<400> 52

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

10 <210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
15 <223> CDR2 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
<400> 53

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

20 <210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
25 <223> CDR1 de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
<400> 54

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

30 <210> 55
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> dominio variable de la cadena pesada, hMab 2F11-g1
<400> 55

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

- <210> 56
- <211> 106
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> dominio variable de la cadena ligera, hMab 2F11-g1
- <400> 56

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

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

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

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

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

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

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

- 10 <210> 57
- <211> 107
- <212> PRT

ES 2 557 454 T3

<213> Homo sapiens
<400> 57

```

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

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

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

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

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

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

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

```

5 <210> 58
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58

```

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

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

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

```

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

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

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

<210> 59

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

ES 2 557 454 T3

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

<210> 61
 <211> 327

ES 2 557 454 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región constante de la cadena pesada humana derivada de una IgG4 con mutación en S228P

5

<400> 61

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 62
 <211> 972
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 62

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg

ES 2 557 454 T3

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

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

<210> 63

<211> 972

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CSF-1R mutante en L301S Y969F

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
660 665 670

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser

ES 2 557 454 T3

915 920 925

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

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

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

- <210> 64
- <211> 493
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Dominio extracelular de CSF-1R humano
- <400> 64

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
 165 170 175
 Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
 180 185 190
 Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
 195 200 205
 Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
 210 215 220
 Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
 245 250 255
 Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
 260 265 270
 Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln
 275 280 285
 Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val
 290 295 300
 Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu
 305 310 315 320
 Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr
 325 330 335
 Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu
 340 345 350
 Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly
 355 360 365
 Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu
 370 375 380
 Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys
 385 390 395 400
 Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser
 405 410 415
 Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp

ES 2 557 454 T3

420 425 430

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

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

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

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

- <210> 65
- <211> 388
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> fragmento delD4 de CSF-1R humano
- <400> 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Phe Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn
275 280 285

Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn
290 295 300

Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gln Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln
325 330 335

Glu Pro Phe His Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr
340 345 350

Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly
355 360 365

Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His
370 375 380

Pro Pro Asp Glu
385

ES 2 557 454 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> fragmento D1-D3 de CSF-1R humano
 <400> 66

5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

Asn Leu Ile Gln
 290

5 <210> 67
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> peptide señal
 <400> 67

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

Trp His Gly Gln Gly
 20

10 <210> 68
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 68
 cacctccatg ttctccggt acccccaga ggtaag 36

20 <210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 69

Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

25 <210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <400> 70

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

<210> 71

ES 2 557 454 T3

<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 71

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Ile Ser
1 5 10

5
<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
10 <400> 72

Gly Gln Ser Phe Thr Tyr Pro Thr
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
15 <213> Mus musculus
<400> 73

Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Mus musculus
<400> 74

Lys Ala Ser Glu Asp Val Gly Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 75
<211> 116
<212> PRT
25 <213> Mus musculus
<400> 75

ES 2 557 454 T3

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

<210> 76
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 76

5

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

ES 2 557 454 T3

<210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 77

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 78
 <211> 16
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 78

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

<210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 79

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe Asp Ile Ser
 1 5 10

<210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <400> 80

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <400> 81

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 82
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 82

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 83
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <400> 83

ES 2 557 454 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 84
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 84

5

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque
- 5 a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 7 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 8.
2. Un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque
- 10 a) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 23 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 24, o
- b) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32, o
- 15 c) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40, o
- d) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 47 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 48, o
- 20 e) el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 55 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 56.
- 25 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 31 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 32.
- 30 4. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada es el Id. de Sec. N°: 39 y el dominio variable de la cadena ligera es el Id. de Sec. N°: 40.
5. Un anticuerpo de unión a CSF-1R humano, caracterizado porque
- 35 a) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 1, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 2, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 3, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 4, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 5, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 6, o
- 40 b) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 17, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 18, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 19, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 20, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 21, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 22, o
- 45 c) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 25, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 26, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 28, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 29, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 30, o
- 50 d) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 33, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 34, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 36, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 37, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 38, o
- 55 e) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 41, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 42, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 43, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 44, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 45, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 46, o
- 60 f) el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 49, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 50, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 51, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 52, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 53, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 54.
- 65 6. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 25, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 26, y una región CDR1 de

- Id. de Sec. N°: 27, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 28, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 29, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 30.
- 5 7. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el dominio variable de la cadena pesada comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 33, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 34, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 35, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una región CDR3 de Id. de Sec. N°: 36, una región CDR2 de Id. de Sec. N°: 37, y una región CDR1 de Id. de Sec. N°: 38.
- 10 8. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicho anticuerpo es de subclase IgG1 humana o es de subclase IgG4 humana.
9. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, caracterizado porque dicho anticuerpo es de subclase IgG1 humana.
- 15 10. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un anticuerpo según las reivindicaciones de 1 a 7.
11. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 20 12. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para uso en el tratamiento de la pérdida ósea.
13. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para su utilización en la prevención o tratamiento de la metástasis.
- 25 14. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para uso en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.
15. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 7.
- 30 16. Un vector de expresión caracterizado porque comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15 para la expresión del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 en una célula huésped procariota o eucariota no humana.
- 35 17. Una célula huésped procariota o eucariota no humana que comprende un vector según la reivindicación 12.
18. Un método para la producción de un anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por expresar un ácido nucleico según la reivindicación 15 en una célula huésped procariota o eucariota no humana y la recuperación de dicho anticuerpo a partir de dicha célula o en el sobrenadante del cultivo celular.
- 40 19. El uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
20. El uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la pérdida ósea.
- 45 21. El uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la metástasis.
- 50 22. El uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones de 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

Fig. 1a

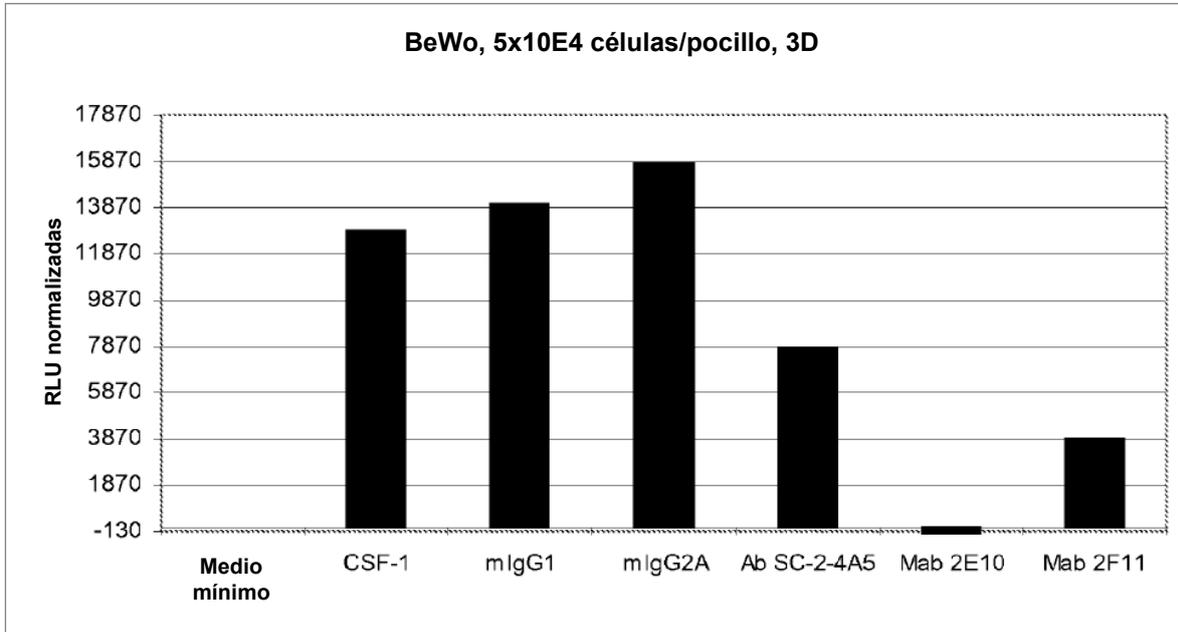


Fig. 1b

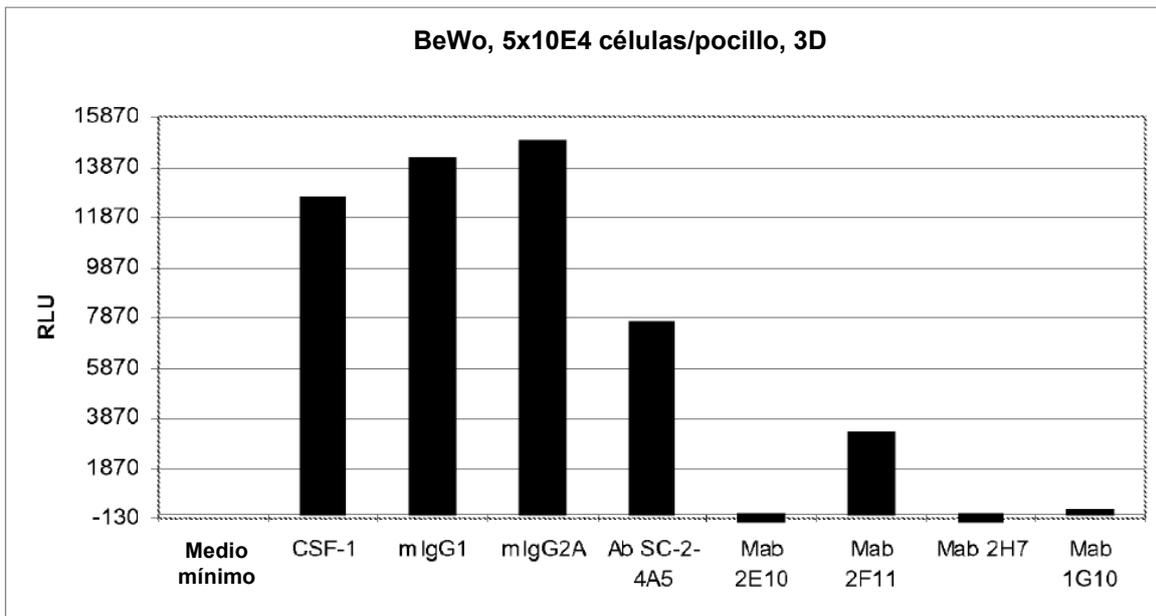


Fig. 2a

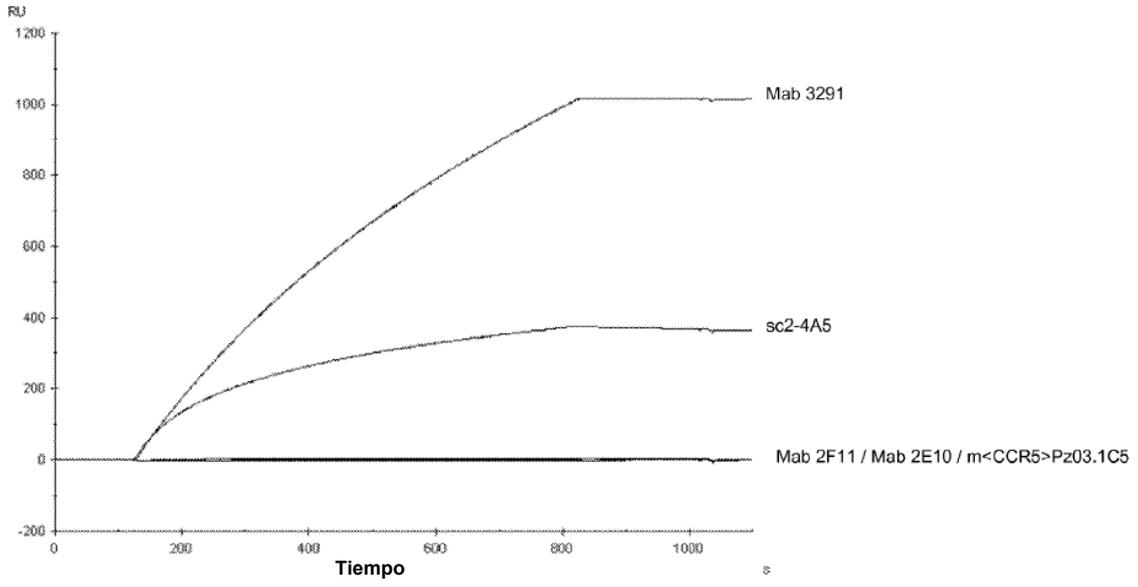


Fig. 2b

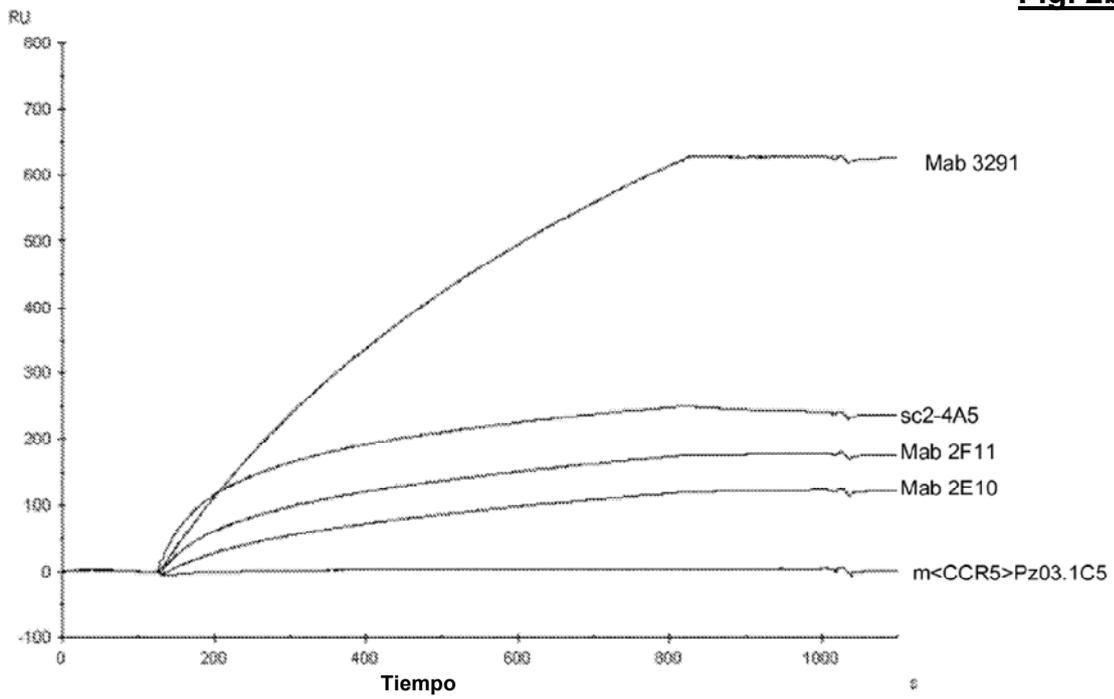


Fig. 2c

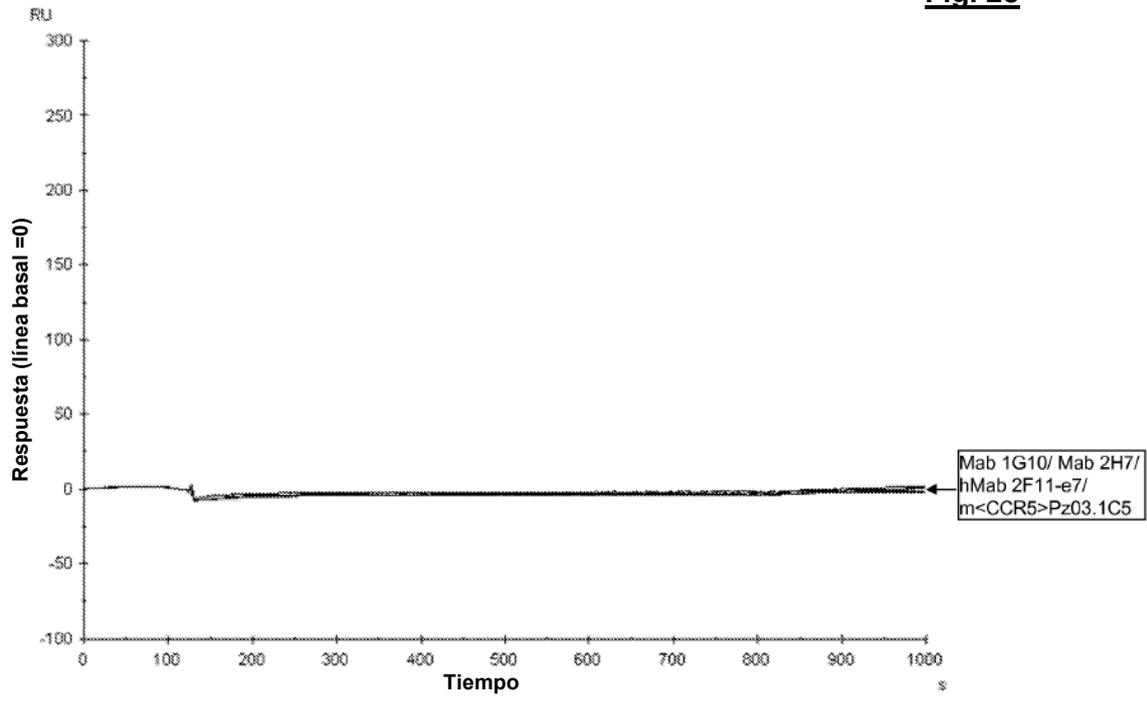


Fig. 2d

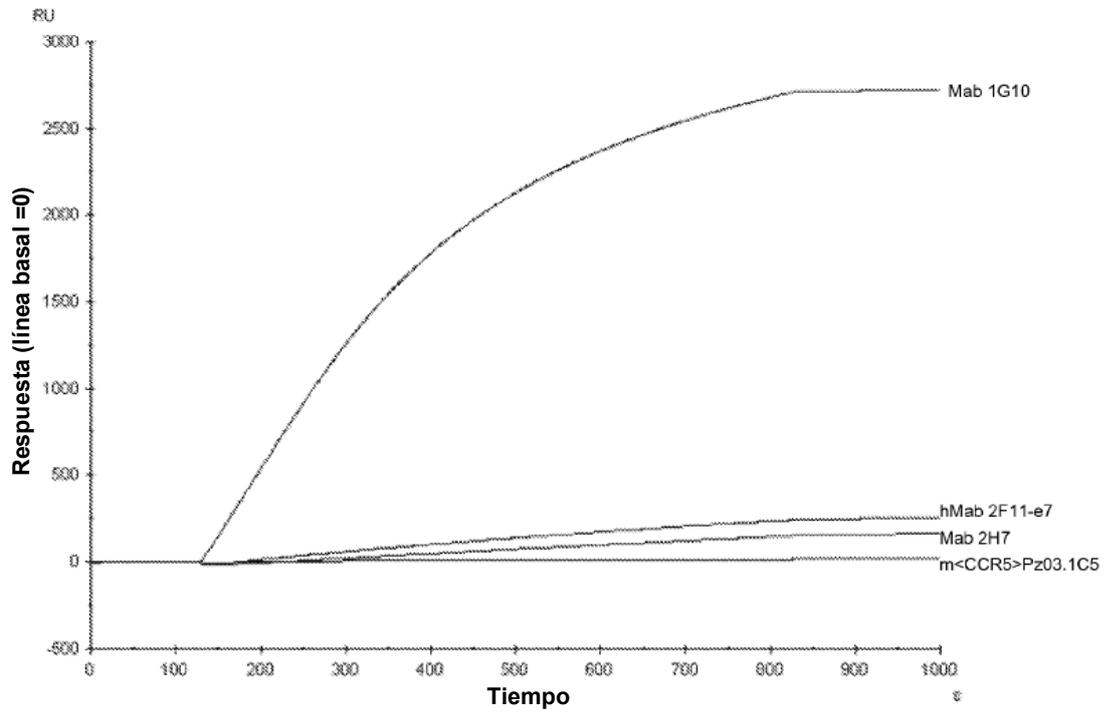
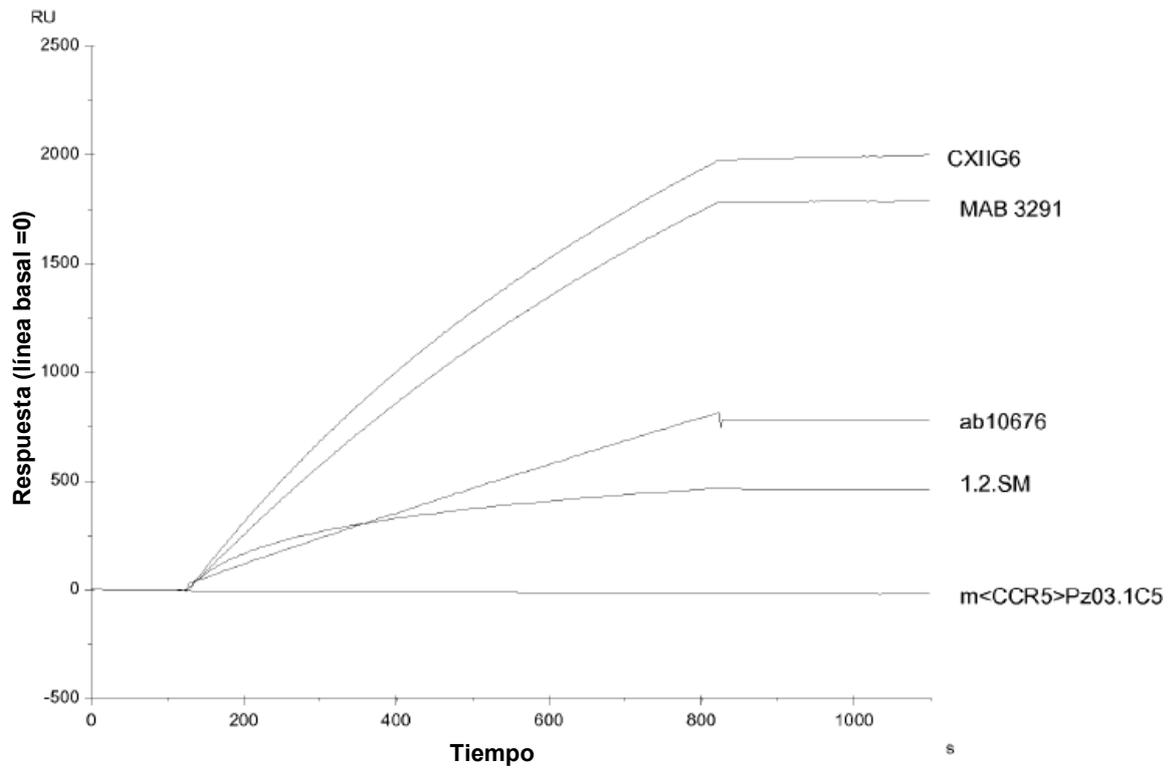


Fig. 2e



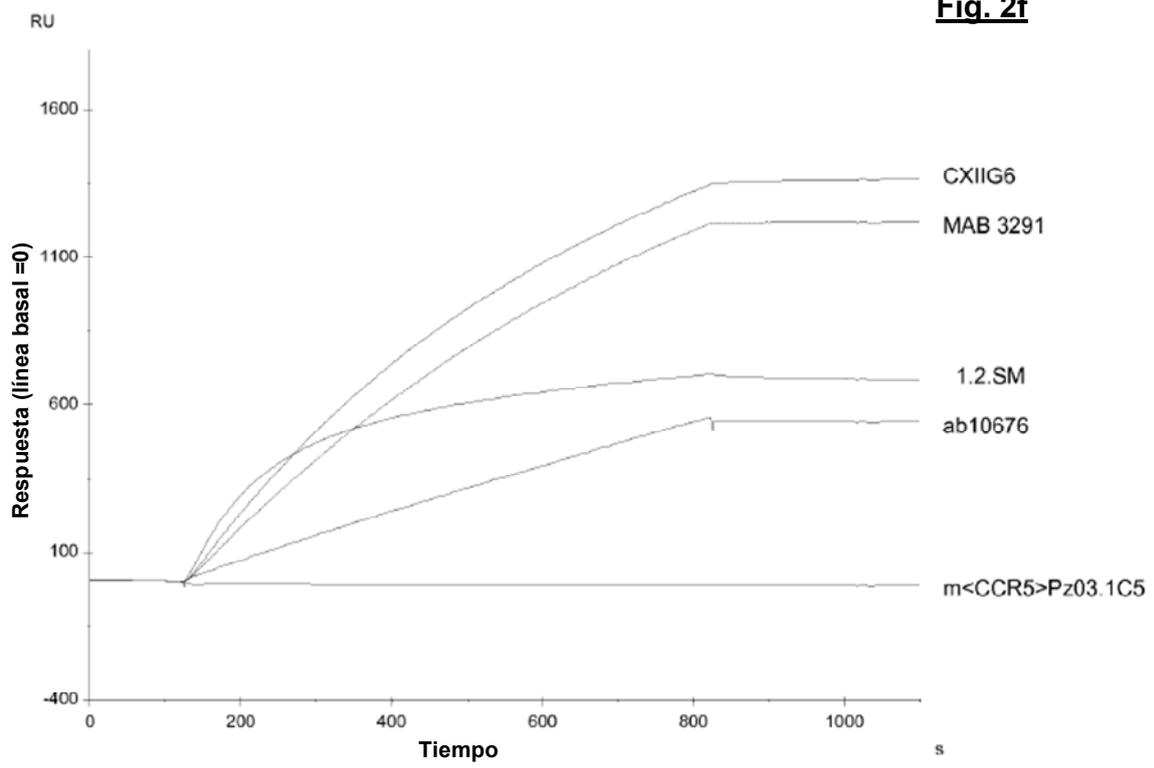


Fig. 3a

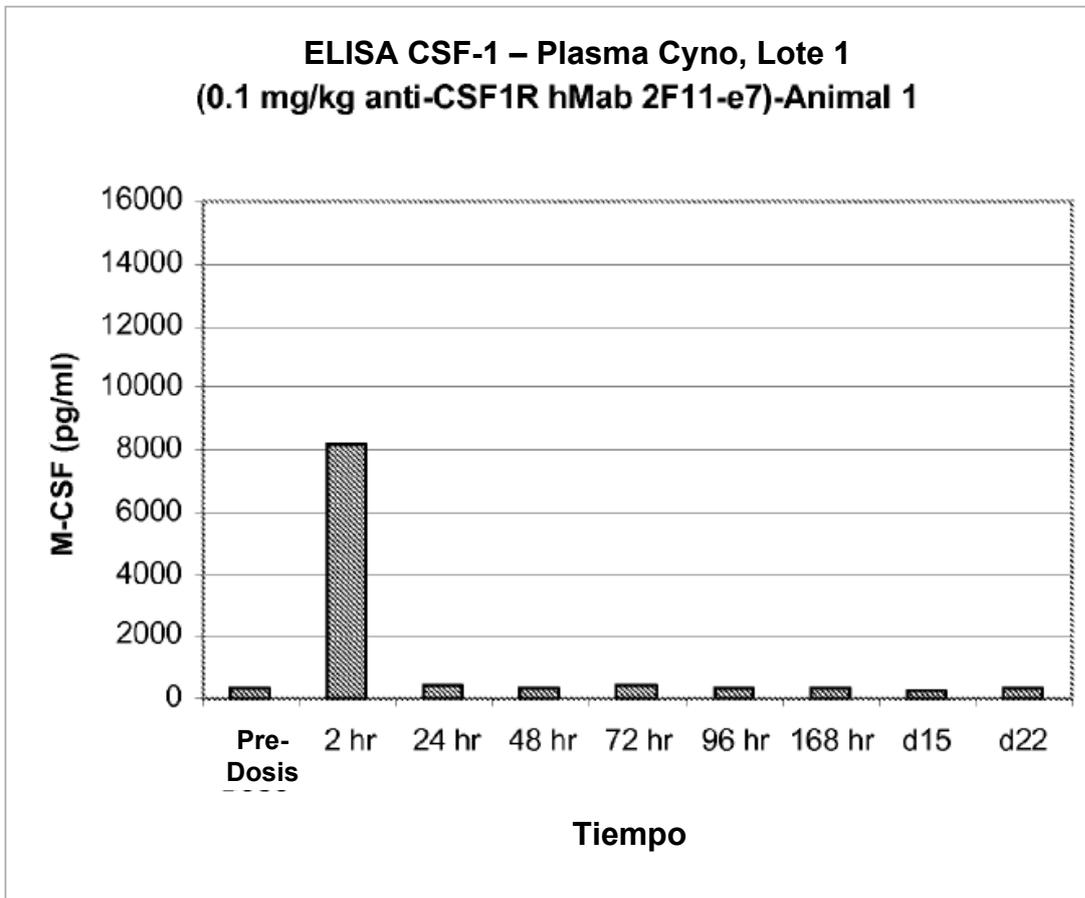


Fig. 3b

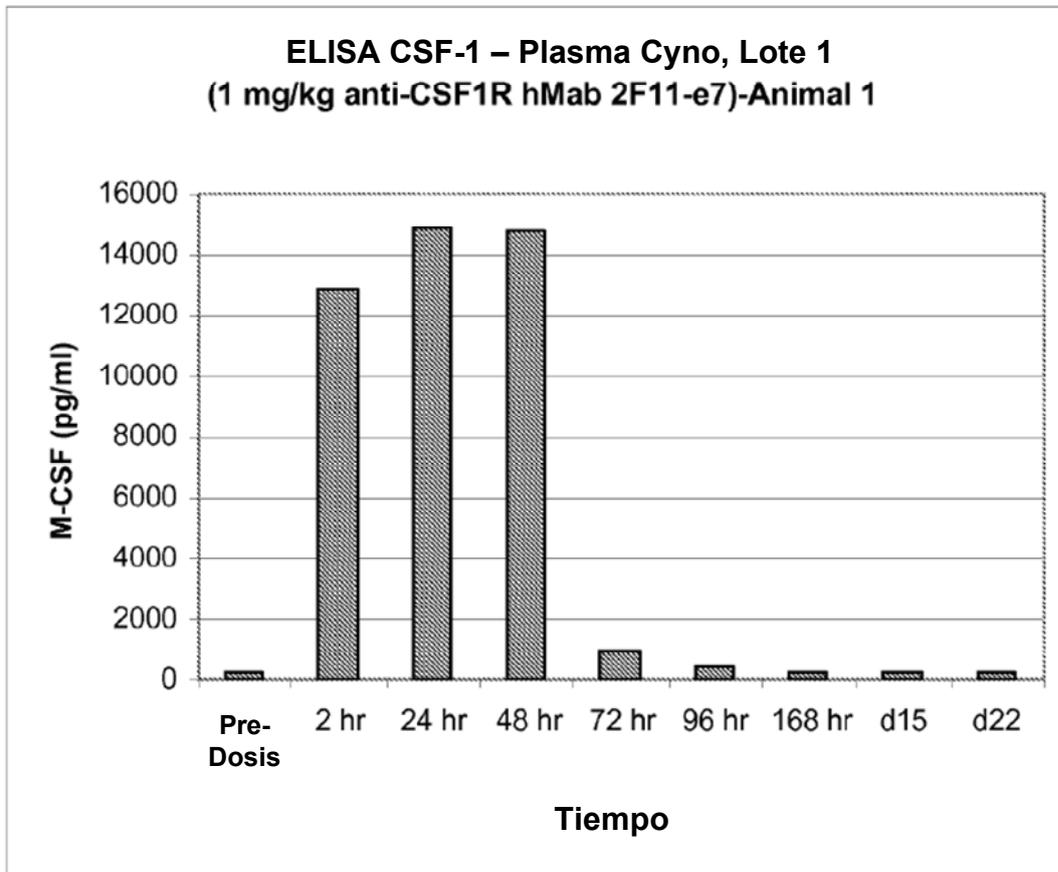


Fig. 3c

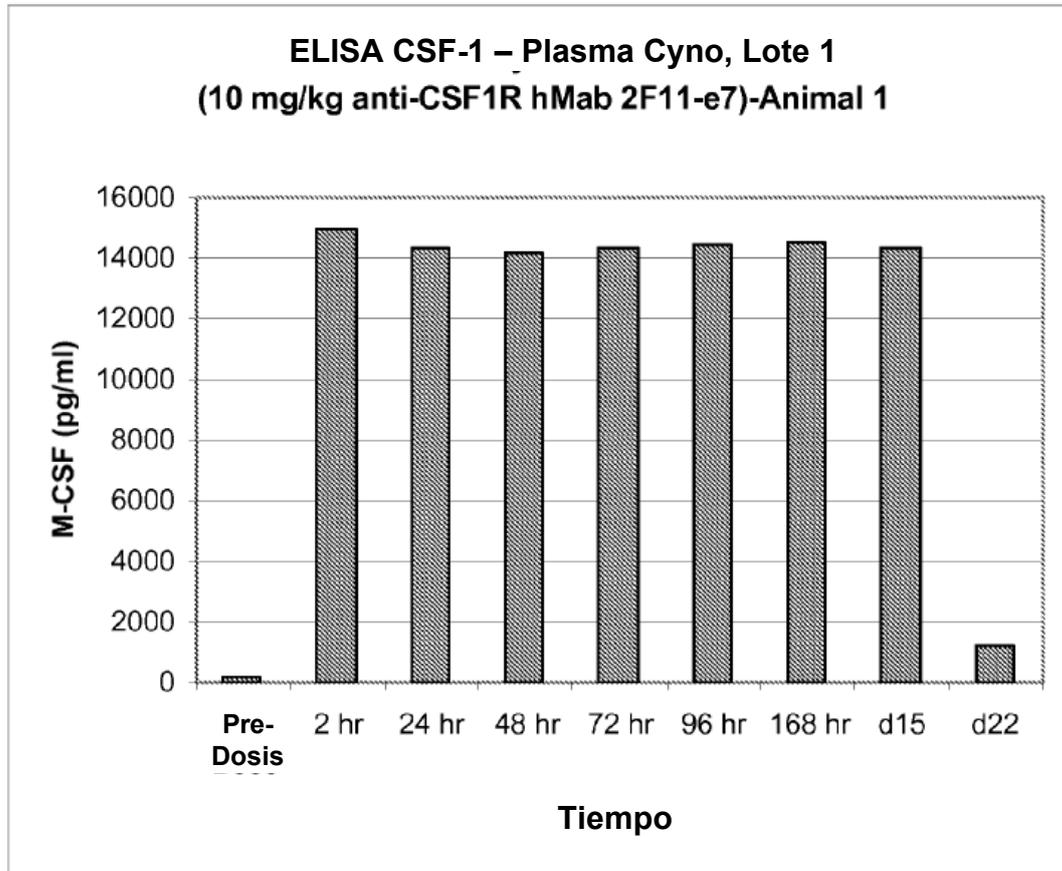


Fig. 3d

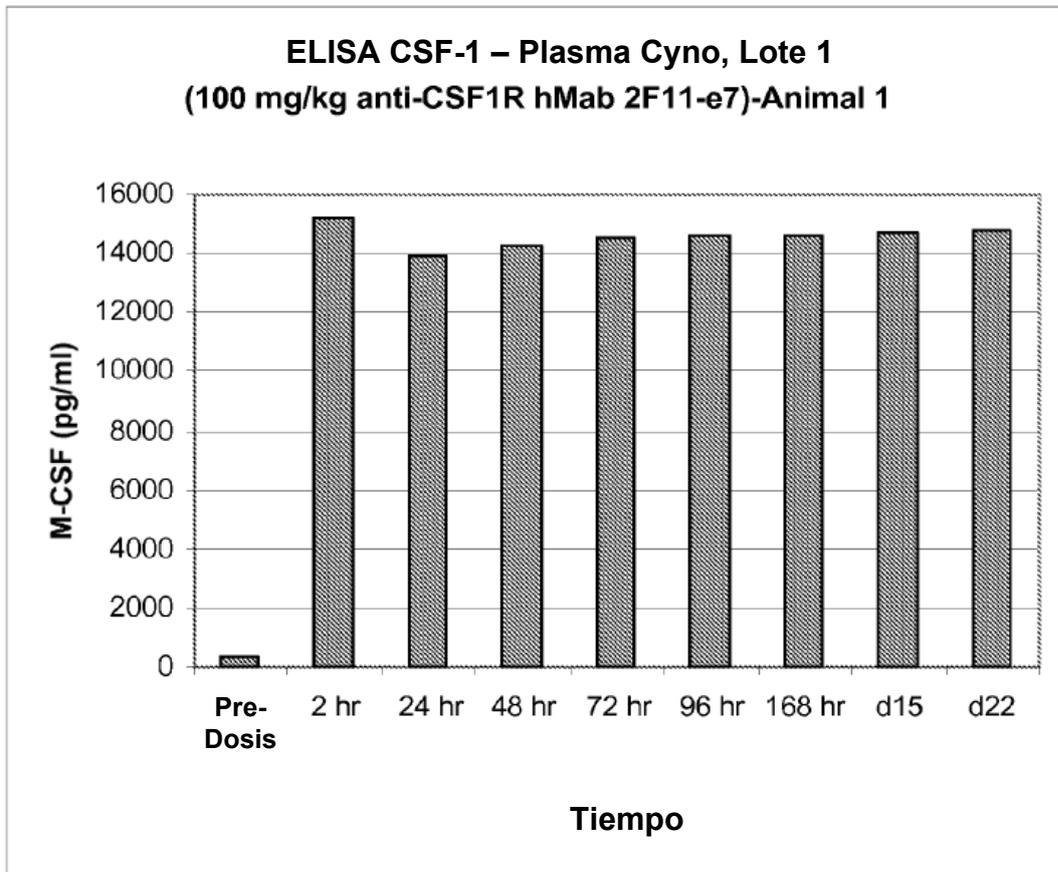


Fig. 4

