

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 300 1014

Señor Director
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496-00007-0000

Fecha: 2011-03-30 17:01:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 65

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 06034496
Asunto : Solicitud de patente para: "Anticuerpos dirigidos a M-CSF".
Solicitante : WARNER LAMBERT COMPANY, LLC AND AMGEN FREMONT INC.
Fecha de solicitud: 7 de Abril de 2006.

1. Yo, Luz Clemencia de PAÉZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá, D.C., identificada con la Cédula de ciudadanía N° 35.456.344 de Usaquén, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. 437 notificado por fijación en lista del 7 de enero de 2011.

2. Mediante el Oficio No. 437 se puso en conocimiento del solicitante el informe del examen de fondo que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la siguiente manera:

3. De la solicitud de patente:

Su Despacho concluye que el capítulo reivindicatorio no cumple con los requisitos de claridad exigidos en el artículo 30 de la Decisión 486. En particular, su Despacho sugiere caracterizar el anticuerpo a partir de su estructura, mencionando las secuencias que lo conforman en la cadena ligera y pesada. Asimismo, sugiere eliminar las reivindicaciones 14 a 17 del pliego reivindicatorio por cuanto se refieren a usos.

Con respecto a lo señalado por su Despacho mi representada desea señalar lo siguiente:

Con el fin de atender las anteriores observaciones y de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486, se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio como sustituto del anteriormente presentado. En este nuevo pliego reivindicatorio, las antiguas reivindicaciones 1-4, 7, 9-12, 14-17 y 19 no han sido incluidas, de tal manera que el nuevo pliego reivindicatorio se encuentra conformado por 14 reivindicaciones y la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada. A este respecto, deseamos poner de presente, que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio, mi

CAVELIER

ABOGADOS

representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud. De esta manera, de acuerdo con el artículo 36 de la Decisión 486, mi representada se reserva el derecho a presentar una solicitud divisional de patente con las reivindicaciones eliminadas, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

Adicionalmente, mi representada desea poner de presente que la nueva reivindicación independiente 1 (antigua reivindicación 5) permite establecer con precisión el alcance de la invención, toda vez que se refiere a un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la M-CSF caracterizado por una región variable de cadena liviana y una región variable de cadena pesada y especifica las secuencia de dichas cadenas livianas o pesadas, i.e. las secuencias (CDR) que comprende el anticuerpo y sus secuencias variables.

Adicionalmente, se ha incluido una nueva reivindicación de método la cual se encuentra caracterizada de acuerdo con nuestra práctica, i.e. por las etapas que hacen el proceso novedoso e inventivo frente a procesos para la obtención de un anticuerpo anti-M-CSF conocidos en el estado del arte.

Así entonces, teniendo en cuenta las modificaciones efectuadas al capítulo reivindicatorio y las anteriores aclaraciones, consideramos que quedarían subsanadas las objeciones que por claridad hizo su Despacho ya que el nuevo capítulo reivindicatorio permite determinar el alcance de la protección reivindicada de manera concreta y compararla frente al estado del arte, de acuerdo con las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486. Sin embargo, en el evento que el Despacho considere que una modificación adicional sea necesaria, respetuosamente le solicito hacer uso de la facultad que le otorga el artículo 45 inciso 2. de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina a efecto de requerir nuevamente de nuestra parte cualquier complementación o aclaración.

Con respecto a la objeción formulada por el Señor Examinador en relación con el hecho que la presente solicitud no es una invención por cuanto los anticuerpos reivindicados se encuentran en la naturaleza, respetuosamente deseamos poner de presente que no compartimos su opinión por las siguientes razones:

Los anticuerpos reivindicados se refieren a anticuerpos que se generaron por los investigadores de la presente solicitud con ratones genéticamente modificados (ver ejemplos I y II). En algunos casos, los inventores alteraron el ADN que codifica los anticuerpos a partir de los ratones genéticamente modificados. En consecuencia, los anticuerpos revelados en la presente solicitud no hacen parte de seres vivos que se encuentran en la naturaleza, de material biológico existente en la naturaleza, o material que puede ser fácilmente aislado de cualquier ser vivo natural existente sino de material modificado genéticamente y por tanto la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

Finalmente, deseamos poner de presente que luego de revisar el pliego descriptivo de la presente solicitud, mi representada ha decidido presentar un nuevo pliego descriptivo con el de corregir ciertos errores tipográficos encontrados en el párrafo (0183) de la misma.

4. Estudio de patentabilidad.

Su Despacho concluye que el documento US 5,491,065 (D1) afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 4 y 20 y el documento US 6,184,354 (D2) el nivel inventivo de las reivindicaciones 2-5.

Con respecto a lo señalado por su Despacho, mi representada desea poner de presente lo siguiente:

En primer lugar, deseamos poner de presente que toda vez que el documento D1 afectaba únicamente la novedad de las reivindicaciones 1, 4 y 20 y dichas reivindicaciones no han sido incluidas en el nuevo pliego reivindicatorio, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

Ahora bien, con respecto a que el documento D2 afecta el nivel inventivo de la presente solicitud de patente, deseamos poner de presente lo siguiente:

De acuerdo con el artículo 18 de la Decisión 486:

"Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

De lo anterior, es claro que para determinar si una invención es inventiva o no, el examinador debe determinar si la misma se deriva de manera obvia a partir del estado de la técnica.

El estado de la técnica es el conjunto de conocimientos técnicos dentro del campo de la invención que hayan sido publicados por cualquier medio, antes de la fecha de solicitud de la invención o de la prioridad reivindicada. A pesar de que esta búsqueda de anterioridades se realiza a posteriori, es decir, tomando como punto de partida la invención y la forma como efectivamente se solucionó el problema técnico, al realizar la evaluación de nivel inventivo el examinador debe ponerse en el lugar del inventor al momento de realizar la invención junto con los conocimientos técnicos existentes al momento de la solicitud con el fin de entender el esfuerzo y análisis que dicho inventor requirió para resolver el problema técnico planteado. Lo anterior, por cuanto si la invención es analizada con los avances tecnológicos hoy conocidos y adicionalmente se toma como punto de partida la forma como efectivamente se solucionó el problema técnico, la invención en todos los casos le resultará obvia y evidente.

De otro lado, se debe tener en cuenta el alcance de las palabras obvio y evidente, y cómo estas deben ser tenidas en cuenta al momento que el técnico medio hace el examen de nivel inventivo.

Según la jurisprudencia del Tribunal, es obvio "aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad"". ¹

Por otro lado, el Tribunal define aquello que es evidente como "la certeza clara y manifiesta de lo que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". ²

Así entonces, es posible concluir que para ser pertinentes en la evaluación de nivel inventivo de la presente invención, los documentos citados deberían revelar sugerencias y enseñanzas claras para el técnico en la materia que lo lleven a obtenerla. Para este fin, el Señor Examinador debe examinar si, de conformidad con dichos documentos (el estado de la técnica más próximo), una persona versada en la materia habría o no propuesto las características técnicas que distinguen la invención reivindicada y que permiten alcanzar los resultados obtenidos por dicha invención.

Teniendo en cuenta el anterior, podemos concluir que una invención no se considera obvia u evidente y por tanto cumple con el requisito de nivel inventivo cuando la misma haya resultado a través de estudio y experimentación (investigación) y constituya un adelanto tecnológico, materializado en un resultado inesperado (mejorado) y además no evidente para alguien del oficio.

Ahora bien, con el fin de demostrar que los argumentos esgrimidos por el Señor Examinador no resultan de recibo en el presente caso, toda vez que sus conclusiones no son adecuadas frente a la metodología que debe adelantarse para determinar el nivel inventivo de una solicitud de patente, mi representada desea poner de presente lo siguiente:

La nueva reivindicación 1 se refiere a un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la M-CSF, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de amino ácido de los seis CDR del anticuerpo 8.10.3F o 9.14.4I. Sin embargo, D2 no enseña ni sugiere anticuerpos anti-M-CSF monoclonales que tienen las secuencias de aminoácidos CDR de los anticuerpos 8.10.3F o 9.14.4I.

Además, la solicitud muestra que los anticuerpos 8.10.3F y 9.14.4I inhiben la proliferación celular del ratón monocítico en respuesta a la M-CSF (ejemplo III), inhiben los cambios de forma de los monocitos dependientes de M-CSF (ejemplo IV), inhiben la unión del M-CSF al receptor c-fms (Ejemplo V), y cambian los niveles de monocitos en un modelo de monos cinomolgos (Ejemplo X). En contraste, D2 no enseña ni sugiere anticuerpos anti-M-CSF monoclonales con las secuencias específicas de CDR del anticuerpo 8.10.3F o 9.14.4I y/o que dichos anticuerpos son capaces de disminuir los niveles de monocitos en macacos. A este respecto, vale la pena resaltar que el desarrollo de anticuerpos monoclonales inhibidores es un campo impredecible toda vez que la información relacionada con la función de un antígeno no hace que la generación de un anticuerpo inhibidor específico, a partir de una cantidad indeterminada de anticuerpos anti-M-CSF potenciales, sea previsible con absoluta certeza.

¹ Proceso No. 192-IP-2005. Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina.

² Ibidem.

CAVELIER

ABOGADOS

Debido a lo anterior, no podemos estar de acuerdo con la metodología adelantada para determinar el nivel inventivo de la presente invención por cuanto su Despacho no especifica claramente cómo las enseñanzas divulgadas en el documento citado llevarían a una persona versada en la materia a solucionar el problema técnico planteado en la presente solicitud, i.e. proporcionar anticuerpos que restrinjan la actividad de M-CSF, pues esta proteína es un regulador de la función, activación y supervivencia de monocitos/macrófagos y ha sido relacionada con diferentes enfermedades autoinmunes y/o a predecir los efectos obtenidos con los anticuerpos acá reivindicados sin experimentación o investigación alguna al incluir las secuencias específicas de CDR del anticuerpo 8.10.3F o 9.14.4I.

Así entonces, debido a que el documento D2 no enseña ni sugiere las características técnicas del anticuerpo monoclonal reivindicado, es claro que la materia de invención de la presente invención no resulta obvia para una persona versada en la materia técnica correspondiente. Lo anterior, si se tiene en cuenta que la estructura específica del anticuerpo reivindicado no se definió como posible en el documento D2 citado por su Despacho.

5. Visto lo anterior, atentamente solicito a ese Despacho tener en cuenta los argumentos arriba mencionados, de tal forma que al efectuar un examen de patentabilidad riguroso y de conformidad con las disposiciones del Manual para el Examen de Solicitudes de patente, se advierta el nivel inventivo de la materia reivindicada en la presente solicitud.

6. Anexos.

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 14 reivindicaciones.
- Nuevo pliego descriptivo.
- Tasa por \$108.000 por concepto de 4 reivindicaciones adicionales.
- Formulario para modificaciones.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PAÉZ
C.C. N° 35.456.344 de Usaquén
T.P.A. No. 23.555

COLO-15252-841-001-1
COLO-15777-845-001-3
MGM\MGM\ID-189816\WPC15777
No. M-2011-189816\MGM



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1	SOLICITUD DE:	
	☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud	
2	SOLICITANTE Nombre: WARNER-LAMBERT COMPANY LLC y AMGEN FREMONT INC. sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América Direcciones: 201 Tabor Road Morris Plains New Jersey 07950 Estados Unidos de América 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555 Estados Unidos de América Domicilios: Morris Plains New Jersey Estados Unidos de América y Fremont, California, Estados Unidos de América Respectivamente Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3	REPRESENTANTE O APODERADO Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T. P. <u>23.555</u>
4	Número de expediente: <u>06.034.496</u>	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: Presento nuevos capítulos descriptivo y reivindicatorio compuesto por 14 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.	

6	Comprobante de pago No. <u>11-25779</u>	Fecha: <u>23 de marzo de 2011</u>
	Comprobante de pago No. <u>11-25949</u>	Fecha: <u>23 de marzo de 2011</u>
	Comprobante de pago No. <u>11-25958</u>	Fecha: <u>23 de marzo de 2011</u>
	Comprobante de pago No. <u>11-28066</u>	Fecha: <u>29 de marzo de 2011</u>

7	Anexos
	☐ Comprobante de pago de la tasa por \$118.000, por concepto de modificaciones.
	☒ Comprobante de pago por 4 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$108.000.00.
	☐ Poderes, si fuere el caso
	☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8	NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ	FIRMA: <u>Luz Clemencia de Páez</u>
		C.C. <u>35.456.344</u> de Usaquén T.P.A. <u>23.555</u>

MGM

ANTICUERPOS DIRIGIDOS A M-CSF

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] El factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF) es un miembro de la familia de proteínas a la cual se hace referencia como factores de estimulación de colonias (CSFs). El M-CSF es una glicoproteína segregada o de la superficie celular que comprende dos subunidades que están unidas mediante una ligadura de disulfuro con una masa molecular total que varía desde 40 a 90 kD ((Stanley E.R., *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.*, 46:4-10 (1997)). Similarmente a otros CSFs, el M-CSF es producido por macrófagos, monocitos y células del tejido conectivo humano, tales como condrocitos y fibroblastos sinoviales, en respuesta a proteínas tales como la interleucina-1 o el factor de necrosis tumoral alfa. El M-CSF estimula la formación de colonias de macrófagos a partir de células madre progenitoras hematopoyéticas pluripotentes (Stanley E.R., *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.*, 46:4-10 (1997)).

[0002] El M-CSF se liga típicamente a su receptor, *c-fms*, con el fin de ejercer un efecto biológico. *c-fms* contiene cinco dominios Ig extracelulares, un dominio de transmembrana y un dominio intracelular con dos dominios quinasa. En caso de ligarse M-CSF a *c-fms*, el receptor homo-dimeriza e inicia una cascada de rutas de transducción de señales, incluyendo las rutas JAK/STAT, PI3K y ERK.

[0003] El M-CSF es un regulador importante de la función, activación y supervivencia de monocitos/macrófagos. Un número de modelos animales confirmaron el rol de M-CSF en varias enfermedades, incluyendo artritis reumatoide (RA) y cáncer. Los macrófagos comprenden células efectoras clave en RA. Se mostró que el grado de infiltración de la sinovial por macrófagos en RA está estrechamente correlacionado con el grado de destrucción articular subyacente. El M-CSF, producido endógenamente en la articulación reumatoide por monocitos/macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, actúa sobre células del tipo monocito/macrófago para promover su supervivencia y diferenciación en osteoclastos que destruyen huesos, y aumenta funciones celulares pro-inflamatorias tales como citotoxicidad, producción de superóxidos, fagocitosis, quimiotaxis y producción secundaria de citoquinas. Por ejemplo, el tratamiento con M-CSF en el modelo de artritis experimental inducida por ultrasonido en ratas con streptococcus agalactiae conduce a una patología aumentada (Abd, A.H., *et al.*, *Lymphokine Cytokine Res.* 10:43-50 (1991)). Similarmente, inyecciones subcutáneas de M-CSF en un modelo murino de artritis inducida por colágeno (collagen-induced arthritis = CIA), que es un modelo para RA, resulta en una exacerbación significativa de los síntomas patológicos de RA (Campbell I.K., *et al.*, *J. Leuk. Biol.* 68:144-150 (2000)). Además, ratones MRL/lpr que son altamente susceptibles a RA y otras enfermedades autoinmunes tienen elevadas concentraciones basales de M-CSF en el suero (Yui M.A., *et al.*, *Am. J. Pathol.* 139:255-261 (1991)). El requerimiento de M-CSF endógeno para mantener la CIA se demostró por una reducción significativa de la severidad de la enfermedad establecida mediante un anticuerpo monoclonal de ratón que neutraliza M-CSF (Campbell I.K., *et al.*, *J. Leuk. Biol.* 68:144-150 (2000)).

[0004] Con respecto a cáncer, la inhibición de factores de estimulación de colonias mediante oligonucleótidos antisentido suprime el crecimiento de xenoinjertos de tumores embrionarios y del colon en ratones mediante la desaceleración de la destrucción de la matriz extracelular (ECM) mediada por macrófagos (Seyedhossein, A., *et al.*, *Cancer Research*, 62:5317-5324 (2002)).

[0005] La ligadura de M-CSF a *c-fms* y la activación subsecuente de monocitos/macrófagos es importante en un número de estados patológicos. Además de RA y cáncer, los otros ejemplos de estados patológicos relacionados con M-CSF incluyen osteoporosis, artritis destructiva, aterogénesis, glomerulonefritis, enfermedad de Kawasaki e infección con HIV-1, estados patológicos en los cuales monocitos/macrófagos y tipos de célula relacionados juegan un rol. Por ejemplo, osteoclastos son similares a macrófagos y son regulados parcialmente por M-CSF. Las señales de crecimiento y diferenciación inducidas por M-CSF en las etapas iniciales de la maduración de osteoclastos son esenciales para la actividad osteoclástica subsecuente en huesos.

[0006] La pérdida ósea mediada por osteoclastos, tanto en la forma de erosiones focales de los huesos como así también en la forma de osteoporosis juxta-articular más difusa, es un problema mayor no resuelto en RA. Las consecuencias de estas pérdidas óseas incluyen deformaciones de las articulaciones, discapacidad funcional, riesgo

aumentado de fracturas de huesos y mortalidad aumentada. El M-CSF es exclusivamente esencial para la osteoclastogénesis, y el bloqueo experimental de esta citoquina en modelos animales de artritis anula exitosamente la destrucción de las articulaciones. Se conocen rutas destructivas similares para operar en otras formas de artritis destructiva tales como artritis psoriática, y podrían representar rutas apropiadas para una intervención similar.

[0007] La pérdida ósea postmenopáusica resulta de una remodelación defectuosa de los huesos debida a un desacoplamiento de la formación de los huesos de la resorción ósea exuberante mediada por osteoclastos como consecuencia de una deficiencia de estrógeno. Se mostró en ratones, que la neutralización *in-vivo* de M-CSF usando un anticuerpo bloqueante previene completamente el aumento del número de osteoclastos, el aumento de la resorción ósea y la pérdida ósea resultante inducida por ovariectomía.

[0008] Varias líneas de evidencia señalan que M-CSF juega un rol central en aterogénesis y en hiperplasia intimal proliferativa después de un trauma mecánico a la pared arterial. Se mostró que todos los tipos celulares de importancia en lesiones ateroscleróticas expresan M-CSF, y que estas lesiones todavía aumentan por la exposición a lipoproteína oxidada. El bloqueo de la señalización por M-CSF mediante un anticuerpo *c-fms* neutralizante reduce la acumulación de células espuma derivadas de macrófagos en la raíz aórtica de ratones con deficiencia de apolipoproteína E mantenidos con una dieta elevada en grasas.

[0009] Tanto en la glomerulonefritis humana como en la experimental, se encontró que la expresión de M-CSF glomerular está co-localizada con la acumulación, activación y proliferación local de macrófagos, y está correlacionada con el grado de daño glomerular y proteinuria. El bloqueo de la señalización por M-CSF mediante un anticuerpo dirigido contra su receptor *c-fms* disminuye significativamente la acumulación local de macrófagos en ratones durante la respuesta inflamatoria renal inducida por obstrucción urétrica unilateral experimental.

[0010] La enfermedad de Kawasaki (KD) es una vasculitis pediátrica, febril, aguda de causa desconocida. Es muy común y complicaciones serias implican la vasculatura coronaria en la forma de dilatación aneurismal. Los niveles de M-CSF en suero se elevan significativamente en la fase aguda de la enfermedad de Kawasaki, y se normalizan después del tratamiento con inmunoglobulina intravenosa. La artritis de célula gigante (GCA) es una vasculopatía inflamatoria que ocurre principalmente en personas de avanzada edad en las cuales células T y macrófagos infiltran las paredes de arterias medianas y grandes conduciendo a consecuencias clínicas que incluyen ceguera y accidente cerebrovascular debido a la oclusión arterial. La implicación activa de macrófagos en GCA se evidencia por la presencia de elevados niveles de mediadores inflamatorios derivados de macrófagos dentro de las lesiones vasculares.

[0011] Se informó que M-CSF hace los macrófagos derivados de monocitos más susceptibles a la infección con HIV-1 *in vitro*. En un estudio reciente, el M-CSF aumentó la frecuencia con la cual se infectaron macrófagos derivados de monocitos, la cantidad de mRNA HIV expresada por célula infectada y el nivel de DNA proviral expresado por cultivo infectado.

[0012] Dado el rol de M-CSF en varias enfermedades, es deseable un método para inhibir M-CSF.

[0013] Existe una necesidad crítica para anticuerpos anti-M-CSF terapéuticos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La presente invención provee anticuerpos humanos aislados o porciones que ligan antígeno de los mismos que ligan específicamente M-CSF humano y actúan como un antagonista de M-CSF y composiciones que comprenden dicho anticuerpo o porción.

[0015] La invención también provee composiciones que comprenden un anticuerpo anti-M-CSF, la cadena pesada y/o liviana, las regiones variables o las porciones que ligan antígeno del mismo, o moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, cadena de anticuerpo o región variable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, las composiciones pueden comprender además otro componente, tal como un agente terapéutico o un agente diagnóstico. La invención también provee métodos diagnósticos y terapéuticos. En ciertas realizaciones, las composiciones se usan en una cantidad terapéuticamente efectiva necesaria para tratar o prevenir una enfermedad o condición particular.

[0016] La invención también provee métodos para tratar o prevenir una variedad de enfermedades y condiciones tales como, pero no estando limitado a, inflamación, cáncer, aterogénesis, trastornos neurológicos y trastornos cardíacos con una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-M-CSF de la invención, o una porción que liga antígeno del mismo, ácidos nucleicos que codifican dicho anticuerpo, o cadenas pesadas y/o livianas, las regiones variables o porciones que ligan antígeno del mismo.

[0017] La invención provee líneas celulares aisladas, tales como hibridomas, que producen anticuerpos anti-M-CSF o porciones que ligan antígeno de los mismos.

[0018] La invención también provee moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o livianas de anticuerpos anti-M-CSF, las regiones variables de los mismos o porciones que ligan antígeno de los mismos.

[0019] La invención provee vectores y células hospedantes que comprenden las moléculas de ácido nucleico, como así también métodos para producir recombinantemente los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico.

[0020] También se proveen animales o plantas transgénicos no humanos que expresan las cadenas pesadas y/o livianas, o porciones que ligan antígeno de las mismas, de anticuerpos anti-M-CSF.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] Las Figuras 1A y 1B son gráficos que ilustran que los anticuerpos anti-M-CSF resultaron en una disminución relacionada con la dosis de los conteos de monocitos totales en monos macho y hembra durante el tiempo. Los conteos de monocitos se determinaron mediante dispersión de la luz usando un sistema Cell Dyn de Abbott Diagnostics Inc. Los conteos de monocitos se monitorearon desde las 24 horas hasta las 3 semanas después de la administración de vehículo o del anticuerpo 8.10.3 en una dosis de 0; 0,1; 1 ó 5 mg/kg en un volumen de dosis de 3,79 mL/kg durante un período de aproximadamente 5 minutos.

[0022] La Figura 1A se refiere a monos macho.

[0023] La Figura 1B se refiere a monos hembra.

[0024] Las Figuras 2A y 2B son gráficos que ilustran que un tratamiento anti-M-CSF resultó en una reducción del porcentaje de monocitos CD14+CD16+ en monos macho y hembra. Los conteos de monocitos se monitorearon los días 0-21 después de la administración de vehículo o del anticuerpo 8.10.3 en una dosis de 0; 0,1; 1 ó 5 mg/kg en un volumen de dosis de 3,79 mL/kg durante un período de aproximadamente 5 minutos. Los días 1, 3, 7, 14 y 21 después de la inyección de 8.10.3, se determinó para cada mono ensayado el porcentaje de monocitos dentro del subconjunto CD14+CD16+ después de cada extracción de sangre.

[0025] La Figura 2A se refiere a monos macho.

[0026] La Figura 2B se refiere a monos hembra.

[0027] Las Figuras 3A y 3B son gráficos que ilustran que un tratamiento anti-M-CSF resultó en una disminución del cambio porcentual de monocitos totales con todas las dosis del anticuerpo 8.10.3F y anticuerpo 9.14.4I en comparación con los niveles de monocitos del pre-ensayo.

[0028] La Figura 3A muestra datos recolectados de experimentos usando el anticuerpo 8.10.3F.

[0029] La Figura 3B muestra datos recolectados de experimentos usando el anticuerpo 9.14.4I.

[0030] La Figura 4 es una alineación de secuencias de las secuencias de aminoácidos previstas de las regiones variables de cadena liviana y pesada de veintiseis anticuerpos anti-M-CSF en comparación con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de los genes de la región variable correspondiente. Las diferencias entre las secuencias del anticuerpo y las secuencias del gen de la línea germinal se indican mediante letra negrita. Líneas de trazos indican ausencia de cambio con respecto a la línea germinal. Las secuencias subrayadas en cada alineación representan, de izquierda a derecha, las secuencias FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

[0031] La Figura 4A muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 252 (residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4) con la secuencia V_HO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0032] La Figura 4B muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 88 (residuos 21-127 de SEQ ID

NO: 8) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0033] La Figura 4C muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 100 (residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12) con la secuencia V_KL2, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 107).

[0034] La Figura 4D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 3.8.3 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 16) con la secuencia V_KL5, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 109).

[0035] La Figura 4E muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 2.7.3 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 20) con la secuencia V_KL5, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 117).

[0036] La Figura 4F muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 1.120.1 (residuos 21-134 de SEQ ID NO: 24) con la secuencia V_KB3, J_K1 de la línea germinal (SEQ ID NO: 112).

[0037] La Figura 4G muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 252 (residuos 20-136 de SEQ ID NO: 2) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27 J_H6 de la línea germinal (SEQ ID NO: 106).

[0038] La Figura 4H muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 88 (residuos 20-138 de SEQ ID NO: 6) con la secuencia V_H3-7, D_H6-13, J_H4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 105).

[0039] La Figura 4I muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 100 (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10) con la secuencia V_H3-23, D_H1-26, J_H4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 104).

[0040] La Figura 4J muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 3.8.3 (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 14) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 108).

[0041] La Figura 4K muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 2.7.3 (residuos 20-137 de SEQ ID NO: 18) con la secuencia V_H3-33, D_H1-26, J_H4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 110).

[0042] La Figura 4L muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 1.120.1 (residuos 20-139 de SEQ ID NO: 22) con la secuencia V_H1-18, D_H4-23, J_H4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 111).

[0043] La Figura 4M muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 8.10.3 (residuos 21-129 de SEQ ID NO: 44) con la secuencia V_KA27, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0044] La Figura 4N muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 8.10.3 (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 30) con la secuencia V_H3-48, D_H1-26, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

[0045] La Figura 4O muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.14.4 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 28) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0046] La Figura 4P muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.14.4 (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 38) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0047] La Figura 4Q muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.7.2 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 48) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0048] La Figura 4R muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.7.2 (residuos 20-136 de SEQ ID NO: 46) con la secuencia V_H3-11, D_H6-13, J_H6b de la línea germinal (SEQ ID NO: 115).

[0049] La Figura 4S muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.14.4I (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 28) con la secuencia V_KO12 J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0050] La Figura 4T muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.14.4I (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 26) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0051] La Figura 4U muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 8.10.3F (residuos 21-129 de SEQ ID NO: 32) con la secuencia V_KA27, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0052] La Figura 4V muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de

la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 8.10.3F (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 30) con la secuencia V_H3-48, D_H1-26, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

[0053] La Figura 4W muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.7.2IF (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 36) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0054] La Figura 4X muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.7.2IF (residuos 20-136 de SEQ ID NO: 34) con la secuencia V_H3-11, D_H6-13, J_H6b de la línea germinal (SEQ ID NO: 115).

[0055] La Figura 4Y muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.7.2C-Ser (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 52) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0056] La Figura 4Z muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.7.2C-Ser (residuos 20-136 de SEQ ID NO: 50) con la secuencia V_H3-11, D_H6-13, J_H6b de la línea germinal (SEQ ID NO: 115).

[0057] La Figura 4AA muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.14.4C-Ser (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 56) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0058] La Figura 4BB muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.14.4C-Ser (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 54) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0059] La Figura 4CC muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 8.10.3C-Ser (residuos 21-129 de SEQ ID NO: 60) con la secuencia V_KA27, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0060] La Figura 4DD muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 8.10.3C-Ser (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 58) con la secuencia V_H3-48, D_H1-26, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

[0061] La Figura 4EE muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 8.10.3-CG2 (residuos 21-129 de SEQ ID NO: 60) con la secuencia V_KA27, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0062] La Figura 4FF muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 8.10.3-CG2 (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 62) con la secuencia V_H3-48, D_H1-26, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

[0063] La Figura 4GG muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.7.2-CG2 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 52) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0064] La Figura 4HH muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.7.2-CG2 (residuos 20-136 de SEQ ID NO: 66) con la secuencia V_H3-11, D_H6-13, J_H6b de la línea germinal (SEQ ID NO: 115).

[0065] La Figura 4II muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.7.2-CG4 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 52) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0066] La Figura 4JJ muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.7.2-CG4 (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 70) con la secuencia V_H3-11, D_H6-13, J_H6b de la línea germinal (SEQ ID NO: 115).

[0067] La Figura 4KK muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.14.4-CG2 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 56) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0068] La Figura 4LL muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.14.4-CG2 (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 74) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0069] La Figura 4MM muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.14.4-CG4 (residuos 23-130 de

SEQ ID NO: 56) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0070] La Figura 4NN muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.14.4-CG4 (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 78) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0071] La Figura 4OO muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.14.4-Ser (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 28) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0072] La Figura 4PP muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.14.4-Ser (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 82) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0073] La Figura 4QQ muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.7.2-Ser (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 48) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0074] La Figura 4RR muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.7.2-Ser (residuos 20-136 de SEQ ID NO: 86) con la secuencia V_H3-11, D_H6-13, J_H6b de la línea germinal (SEQ ID NO: 115).

[0075] La Figura 4SS muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 8.10.3-Ser (residuos 21-129 de SEQ ID NO: 44) con la secuencia V_KA27, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0076] La Figura 4TT muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 8.10.3-Ser (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 90) con la secuencia V_H3-48, D_H1-26, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

[0077] La Figura 4UU muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 8.10.3-CG4 (residuos 21-129 de SEQ ID NO: 60) con la secuencia V_KA27, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0078] La Figura 4VV muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 8.10.3-CG4 (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 94) con la secuencia V_H3-48, D_H1-26, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

[0079] La Figura 4WW muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 9.14.4G1 (residuos 23-130 de SEQ ID NO: 28) con la secuencia V_KO12, J_K3 de la línea germinal (SEQ ID NO: 103).

[0080] La Figura 4XX muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 9.14.4G1 (residuos 20-135 de SEQ ID NO: 102) con la secuencia V_H3-11, D_H7-27, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 116).

[0081] La Figura 4YY muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena liviana para el anticuerpo 8.10.3FG1 (residuos 21-129 de SEQ ID NO: 32) con la secuencia V_KA27, J_K4 de la línea germinal (SEQ ID NO: 114).

[0082] La Figura 4ZZ muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo 8.10.3FG1 (residuos 20-141 de SEQ ID NO: 98) con la secuencia V_H3-48, D_H1-26, J_H4b de la línea germinal (SEQ ID NO: 113).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definición y técnicas generales

[0083] Salvo que se indique lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados entendidos comúnmente por los entendidos en el arte. Además, siempre que el contexto no requiera lo contrario, los términos en singular deben incluir el plural y los términos en plural deben incluir el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo celular y de tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en ésta son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en el arte.

[0084] Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y según lo descrito en

varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas en toda la presente memoria descriptiva, siempre que no se indique lo contrario. Vea, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), que son incorporados en ésta por referencia. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, según lo realizado comúnmente en el arte o de acuerdo con lo descrito en ésta. Las nomenclaturas usadas en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en ésta son aquellos bien conocidos y usados comúnmente en el arte. Se usan técnicas estándar para síntesis química, análisis químicos, preparaciones farmacéuticas, formulaciones, administración y tratamiento de pacientes.

[0085] Los términos siguientes, salvo indicación en contrario, deben entenderse con los significados siguientes:

[0086] El término "polipéptido" comprende proteínas naturales o artificiales, fragmentos proteicos y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

[0087] El término "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" significa una proteína, polipéptido o anticuerpo que, en virtud de su origen o fuente de derivación, tiene una a cuatro de las características siguientes: (1) no está asociado con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado natural, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la cual se origina naturalmente estará "aislado" de los componentes con los que está asociado naturalmente. Una proteína también puede convertirse en una proteína substancialmente libre de componentes con los cuales está asociada naturalmente mediante una aislación, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en el arte.

[0088] Ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo anti-M-CSF que ha sido purificado por afinidad usando M-CSF, un anticuerpo anti-M-CSF que ha sido sintetizado *in vitro* mediante un hibridoma u otra línea celular y un anticuerpo anti-M-CSF derivado de un ratón transgénico.

[0089] Una proteína o un polipéptido es "substancialmente puro", "substancialmente homogéneo" o "substancialmente purificado" cuando al menos aproximadamente 60 a 75% de una muestra exhibe una sola especie de polipéptido. El polipéptido o la proteína puede ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o proteína substancialmente puro comprenderá típicamente aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra proteica, más usualmente aproximadamente 95%, y preferentemente tendrá una pureza mayor de 99%. La pureza u homogeneidad de la proteína puede ser indicada por un número de medios bien conocidos en el arte, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguida por la visualización de una sola banda del polipéptido al colorear el gel con un colorante bien conocido en el arte. Para ciertos propósitos, puede proveerse una resolución mayor usando HPLC u otros medios de purificación bien conocidos en el arte.

[0090] El término "fragmento polipeptídico", según lo usado en ésta, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero cuya secuencia de aminoácidos remanente es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de ocurrencia natural. En algunas realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos. En otras realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 14, al menos 20, al menos 50 o al menos 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos.

[0091] El término "análogo polipeptídico", según lo usado en ésta, se refiere a un polipéptido que comprende un segmento substancialmente idéntico a una porción de una secuencia de aminoácidos y que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (1) ligadura específica a M-CSF bajo condiciones de ligadura adecuadas, (2) capacidad para inhibir M-CSF.

[0092] Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución (o inserción o delección) de aminoácidos conservativos con respecto a la secuencia que ocurre naturalmente. Análogos típicos tienen una longitud de al menos 20 ó 25 aminoácidos, preferentemente al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos o mayor, y muchas veces pueden tener la longitud del polipéptido de longitud completa.

[0093] En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos del anticuerpo o la porción que liga antígeno del mismo son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) modifican la afinidad de ligadura para formar complejos proteicos o (4) confieren o modifican otras propiedades físicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir varias mutaciones de una secuencia diferente a la secuencia peptídica que ocurre normalmente. Por ejemplo, en la secuencia que ocurre normalmente pueden realizarse sustituciones simples o múltiples de aminoácidos, preferentemente sustituciones con aminoácidos conservativos, preferentemente en la porción del polipéptido fuera del dominio (de los dominios) que forma(n) contactos intermoleculares.

[0094] Una sustitución con un aminoácido conservativo no debe modificar substancialmente las características estructurales de la secuencia parental; por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería modificar la lámina β antiparalela que integra el dominio de ligadura de la inmunoglobulina que ocurre en la secuencia parental, ni debe romper otros tipos de estructura secundarias que caracterizan la secuencia parental. Generalmente, no se usarán análogos de glicina y prolina en una lámina β antiparalela. Ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas por el arte se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991), que son incorporados cada uno en ésta por referencia.

[0095] Análogos no peptídicos son usados comúnmente en la industria farmacéutica como drogas con propiedades análogas a aquellas del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se llaman "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger, *TINS* p.392 (1985); y Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987), que son incorporados en ésta por referencia. Tales compuestos son desarrollados muchas veces con la ayuda de un modelaje molecular computarizado. Los peptidomiméticos estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tal como un anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo formado por: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bien conocidos en el arte. También puede usarse la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina), para generar péptidos más estables. Además, péptidos minimizados (constrained peptides) que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados por métodos conocidos en el arte (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), incorporado en ésta por referencia); por ejemplo, agregando residuos internos de cisteína capaces de formar puentes intramoleculares de disulfuro que ciclizan el péptido.

[0096] Un "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto o una porción que liga antígeno que compete con el anticuerpo intacto por ligadura específica. Vea en general, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Pueden producirse porciones que ligan antígeno mediante técnicas de DNA recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunas realizaciones, las porciones que ligan antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb y fragmentos de regiones determinantes complementarias (CDR), anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo suficiente para conferir al polipéptido ligadura a un antígeno específico.

[0097] Desde el terminal N hasta el terminal C, los dominios variables de ambas, la

cadena liviana y la cadena pesada maduras, comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) o Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

[0098] Según lo usado en ésta, un anticuerpo al cual se hace referencia mediante un número es igual al anticuerpo monoclonal obtenido a partir del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 3.8.3 es el mismo anticuerpo que uno obtenido a partir del hibridoma 3.8.3.

[0099] De acuerdo con lo usado en ésta, un fragmento Fd significa un fragmento de anticuerpo que consiste de los dominios V_H y C_H1 ; un fragmento Fv consiste de los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)) consiste de un dominio V_H .

[0100] En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple (scFv) en el cual dominios V_L y V_H están apareados para formar una molécula monovalente vía un engarce sintético que permite fabricar a los dominios como una sola cadena proteica. (Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988).) En algunas realizaciones, los anticuerpos son diacuerpos, es decir, son anticuerpos bivalentes en los cuales dominios V_H y V_L son expresados sobre una sola cadena polipéptida, pero usando un engarce demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, forzando los dominios de este modo a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de ligadura de antígeno. (Vea, por ejemplo, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), y Poljak R. J. et al., *Structure* 2:1121-1123 (1994).) En algunas realizaciones, pueden incorporarse uno o más CDRs de un anticuerpo de la invención en una molécula, ya sea covalentemente o no covalentemente, para trasformarla en una inmunoadhesina que se liga específicamente a M-CSF. En tales realizaciones, la CDR(s) pueden incorporarse como parte de una cadena polipéptida más larga, pueden ligarse covalentemente a otra cadena polipéptida o pueden incorporarse no covalentemente.

[0101] En realizaciones que tienen uno o más sitios de ligadura, estos pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes.

[0102] Según lo usado en ésta, el término "anticuerpo humano" significa cualquier anticuerpo en el cual las secuencias de los dominios variable y constante son secuencias humanas. El término comprende anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que han sido cambiadas, por ejemplo, para disminuir inmunogenicidad posible, aumentar afinidad, eliminar cisteínas que podrían causar un plegado indeseable, etc. El término comprende tales anticuerpos producidos recombinantemente en células no humanas, que podrían impartir glicosilación no típica de células humanas. Estos anticuerpos pueden prepararse de varios modos, como descrito más abajo.

[0103] El término "anticuerpo quimérico", según lo usado en ésta, significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. En una realización, una o más de las CDRs se derivan de un anticuerpo anti-M-CSF humano. En otra realización, todas las CDRs se derivan de un anticuerpo anti-M-CSF humano. En otra realización, las CDRs de más de un anticuerpo anti-M-CSF humano se encuentran combinadas en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena liviana de un primer anticuerpo anti-M-CSF humano, una CDR2 de la cadena liviana de un segundo anticuerpo anti-M-CSF humano y una CDR3 de la cadena liviana de un tercer anticuerpo anti-M-CSF humano, y las CDRs de la cadena pesada pueden derivarse de uno o más anticuerpos anti-M-CSF diferentes. Además, las regiones framework pueden estar derivadas de uno de los anticuerpos anti-M-CSF del cual se tomaron una o más de las CDRs o de uno o más anticuerpos humanos diferentes.

[0104] Los fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina pueden prepararse fácilmente por los entendidos en el arte siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva. Los terminales amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos se encuentran cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los datos de las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con los datos de bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferentemente, se usan métodos de comparación

computarizados para identificar motivos secuenciales o dominios previstos de conformación proteica que se encuentran en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias proteicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Vea Bowie et al., *Science* 253:164 (1991).

[0105] El término "resonancia en la superficie de un sensor recubierto con la muestra" (surface plasmon resonance), según lo usado en ésta, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecífica en tiempo real mediante la detección de alteraciones de concentraciones proteicas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, vea Jonsson U. et al., *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Jonsson U. et al., *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Jonsson B. et al., *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); y Johnsson B. et al., *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

[0106] El término " K_D " se refiere a la constante del equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

[0107] El término "epítoto" incluye un determinante proteico capaz de ligarse específicamente a un receptor de inmunoglobulina o célula T o de interactuar de otro modo con una molécula. Los determinantes epitópicos consisten generalmente de grupos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, como así también características de carga específicas. Un epítoto puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítoto lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula interactuante (tal como un anticuerpo) se encuentran linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítoto conformacional, los puntos de interacción se encuentran a través de residuos de aminoácidos sobre la proteína separados entre sí. Se dice que un anticuerpo se liga específicamente con un antígeno si la constante de disociación es ≤ 1 mM, preferentemente ≤ 100 nM y más preferentemente ≤ 10 nM. En ciertas realizaciones, la K_D es de 1 pM a 500 pM. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 500 pM y 1 μ M. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 1 μ M y 100 μ M. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 100 mM y 10 nM. Una vez determinado un epítoto o antígeno deseado, es posible generar anticuerpos contra dicho epítoto, por ejemplo, usando las técnicas descritas en la presente invención. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede elucidar información sobre epítopos deseables. Luego, a partir de esta información, es posible rastrear anticuerpos que se ligan competitivamente al mismo epítoto. Un enfoque para lograr esto es conducir estudios de competición cruzada para encontrar anticuerpos que se ligan competitivamente entre sí, por ejemplo los anticuerpos compiten para ligarse al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para anticuerpos "ligantes" en base a su competición cruzada se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 03/48731.

[0108] Según lo usado en ésta, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaciones siguen el uso convencional. Vea *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que es incorporado en ésta por referencia.

[0109] El término "polinucleótido" según lo referido en ésta, significa una forma polimérica de nucleótidos de una longitud de al menos 10 bases, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra simple y de hebra doble.

[0110] El término "polinucleótido aislado", según lo usado en ésta, significa un polinucleótido de origen genómico, cDNA o sintético o alguna combinación de los mismos que, en virtud de su origen o fuente de derivación, tiene una a tres de las características siguientes: (1) no está asociado con el total o una porción de un polinucleótido con el cual el "polinucleótido aislado" se encuentra naturalmente, (2) está ligado operativamente a un polinucleótido al cual no está ligado naturalmente, o (3) no ocurre naturalmente como parte de una secuencia mayor.

[0111] El término "oligonucleótido", según lo usado en ésta, incluye nucleótidos que se encuentran naturalmente y nucleótidos modificados, ligados entre sí mediante enlaces oligonucleotídicos que se encuentran naturalmente y enlaces oligonucleotídicos que no se

encuentran naturalmente. Los oligonucleótidos son un subconjunto polinucleotídico que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menor. Preferentemente los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y más preferentemente una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 a 40 bases. Los oligonucleótidos usualmente tienen una sola hebra, por ejemplo en el caso de cebadores y sondas; si bien oligonucleótidos pueden ser de doble hebra, por ejemplo para el uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos de sentido o antisentido.

[0112] El término "nucleótidos que se encuentran naturalmente", según lo usado en ésta, incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados", según lo usado en ésta, incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o substituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" referido en ésta incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Vea, por ejemplo, LaPlanche *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon *et al.*, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), cuyas revelaciones están incorporadas en ésta por referencia. Si deseado, un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección.

[0113] Secuencias "enlazadas operativamente" incluyen ambas, secuencias de control de expresión que se encuentran en posición contigua con el gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de expresión", según lo usado en ésta, significa secuencias polinucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificadoras a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de iniciación de la transcripción, terminación, promotoras e intensificadoras adecuadas; señales de procesamiento de RNA eficientes, tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplasmático; secuencias que aumentan la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso de Kozak); secuencias que aumentan la estabilidad de la proteína; y, si deseado, secuencias que aumentan la secreción de la proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere en dependencia del organismo hospedante; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente el promotor, el sitio de ligadura ribosomal y la secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" tiene la intención de incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras y secuencias de compañero de fusión.

[0114] El término "vector", según lo usado en ésta, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido ligada. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido, es decir, un bucle circular de DNA de doble hebra al cual pueden ligarse segmentos adicionales de DNA. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, al cual pueden ligarse segmentos de DNA adicionales en el genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la cual son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores mamíferos episomales). En otras realizaciones, los vectores (por ejemplo, vectores mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedante al ser introducidos en la célula hospedante, y de ese modo son replicados conjuntamente con el genoma del hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están ligados operativamente. A tales vectores se hace referencia en ésta como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión").

[0115] El término "célula hospedante recombinante" (o simplemente "célula hospedante"), según lo usado en ésta, significa una célula en la cual ha sido introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que los términos "célula

hospedante recombinante" y "célula hospedante" no significan solamente la célula objeto particular sino también la progenie de tal célula. Como pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas, debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie, de hecho, puede ser no idéntica a la célula parental, pero aún estar incluida dentro del alcance del término "célula hospedante" usado en ésta.

[0116] El término "hibridar selectivamente" referido en ésta significa ligar en forma detectable y específica. Polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación y lavado que minimizan la ligadura detectable de cantidades apreciables a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de "elevada severidad" o "altamente estrictas" para lograr condiciones de hibridación selectiva, condiciones que son conocidas en el arte y discutidas en ésta. Un ejemplo de condiciones de "elevada severidad" o "altamente estrictas" son presentadas en un método para incubar un polinucleótido con otro polinucleótido, método en el cual un polinucleótido puede ser fijado a una superficie sólida, tal como una membrana, en un buffer de hibridación de SSPE o SSC 6X, formamida al 50%, reactivo de Denhardt 5X, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado a una temperatura de hibridación de 42°C durante 12-16 horas, seguido por dos lavados a 55°C, usando un buffer de lavado de SSC 1X, SDS al 0,5%. Vea también Sambrook et al., *supra*, pp. 9.50-9.55.

[0117] El término "porcentaje de identidad de secuencias" en el contexto de secuencias de ácido nucleico significa el porcentaje de residuos idénticos al comparar y alinear una primera secuencia contigua para determinar su correspondencia máxima con una segunda secuencia contigua. La longitud de la comparación de identidad de secuencias puede abarcar al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más usualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos y preferentemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. En el arte se conoce un número de algoritmos diferentes que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, secuencias polinucleotídicas pueden compararse usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas de la versión 10.0 del paquete de software Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, provee alineamientos y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones que presentan la mejor superposición entre las secuencias problema y de referencia (between the query and search sequences) (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); incorporados en ésta por referencia). Siempre que no sea especificado de otro modo, se usan parámetros predeterminados para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencias entre ácidos nucleicos puede ser determinado usando FASTA con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntaje) o usando Gap con sus parámetros predeterminados provistos en la versión 6.1 de GCG, incorporada en ésta por referencia.

[0118] Una referencia a una secuencia nucleotídica comprende su complemento, siempre que no sea especificado de otro modo. Por lo tanto, debe entenderse que una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular comprende su hebra complementaria, que es su secuencia complementaria.

[0119] El término "porcentaje de identidad de secuencias" significa un cociente, expresado como un porcentaje del número de residuos idénticos sobre el número de residuos comparados.

[0120] El término "similitud substancial" o "similitud substancial de secuencias", al hacer referencia a un ácido nucleico o un fragmento del mismo, significa que al alinear óptimamente dicho ácido nucleico o fragmento, con inserciones o deleciones nucleotídicas apropiadas, con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe una identidad de secuencias nucleotídicas de al menos aproximadamente 85%, preferentemente al menos aproximadamente 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido para determinar la identidad de secuencias, tales como

FASTA, BLAST o Gap, discutidos precedentemente.

[0121] Cuando se aplica a polipéptidos, el término "identidad substancial" significa que cuando dos secuencias peptídicas son alineadas óptimamente, tal como por el programa GAP o BESTFIT, usando pesos predeterminados del intervalo no homólogo (GAP), comparten una identidad de secuencias de al menos 70%, 75% y 80%, preferentemente al menos una identidad de secuencias de 90% ó 95%, y más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 97%, 98% ó 99%. En ciertas realizaciones, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren en sustituciones con aminoácidos conservativos. Una "sustitución con un aminoácido conservativo" es una sustitución en la cual un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución con un aminoácido conservativo no cambiará substancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los cuales dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencias puede ser ajustado hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los entendidos en el arte. Vea, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxil-alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptofano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

[0122] Alternativamente, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de semejanza algorítmica (log-likelihood matrix) PAM250 revelada en Gonnet *et al.*, *Science* 256:1443-45 (1992), incorporado en ésta por referencia. Un reemplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de semejanza logarítmica PAM250.

[0123] La identidad de secuencias para polipéptidos se mide típicamente usando software para análisis de secuencias. Un software para análisis de proteínas compara secuencias usando medidas de similitud asignadas a varias sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones con aminoácidos conservativos. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con parámetros predeterminados, según lo especificado con los programas, para determinar homología de secuencias o identidad de secuencias entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies y organismos, o entre una proteína natural y una mutación de la misma. Vea, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA con parámetros predeterminados o recomendados, vea GCG, versión 6.1. (University of Wisconsin WI) FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) provee alineaciones y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones que presentan la mejor superposición entre las secuencias problema y de referencia (between the query and search sequences) (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* Otro algoritmo preferido, al comparar una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos, es el programa de computación BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros predeterminados provistos con el programa. Vea, por ejemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

[0124] La longitud de las secuencias polipeptídicas cuya homología se compara será generalmente de al menos aproximadamente 16 residuos de aminoácidos, usualmente al menos aproximadamente 20 residuos, más usualmente al menos aproximadamente 24 residuos, típicamente al menos aproximadamente 28 residuos, y preferentemente mayor de aproximadamente 35 residuos. Cuando se investiga en una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias de aminoácidos.

[0125] De acuerdo con lo usado en ésta, los términos “marcador” o “marcado” se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una realización, el marcador es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido con marcador radioactivo o fijación de grupos de biotín a un polipéptido, grupos que pueden ser detectados por avidina marcada (por ejemplo, streptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En otra realización, la etiqueta o marcador puede ser terapéutico, por ejemplo, un conjugado de droga o toxina. En el arte se conocen varios métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas que pueden usarse. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: radioisótopos o radionuclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, sustancias fosforescentes a base de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, α -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotín, epítopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reporter secundario (por ejemplo, secuencias apareadas de cierres de leucina (leucine zipper pair sequences), sitios de ligadura para anticuerpos secundarios, dominios que ligan metales, rótulos de epítopes), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tal como toxina pertusis, taxol, citocalacina B, gramicidina D, bromuro de etilio, hemetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colquicina, toxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, los marcadores están unidos mediante brazos espaciadores de longitud variable para reducir el potencial de impedimento estérico.

[0126] Se entenderá que en toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “comprendiendo” implicará la inclusión de una entidad o grupo de entidades, pero no la exclusión de cualquier otra entidad o grupo de entidades.

Anticuerpos anti-M-CSF humanos y caracterización de los mismos

[0127] En una realización, la invención provee anticuerpos anti-M-CSF humanizados. En una realización, la invención provee anticuerpos anti-M-CSF humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-M-CSF humanos se producen mediante la inmunización de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un roedor, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humana de modo que el roedor produce anticuerpos humanos.

[0128] Un anticuerpo anti-M-CSF de la invención puede comprender una cadena liviana kappa humana o una cadena liviana lambda humana o una secuencia de aminoácidos derivada de la misma. En algunas realizaciones que comprenden una cadena liviana kappa, el dominio variable de la cadena liviana (V_L) es codificado en parte por un gen $V_{\kappa}\text{O12}$, $V_{\kappa}\text{L2}$, $V_{\kappa}\text{L5}$, $V_{\kappa}\text{A27}$ o $V_{\kappa}\text{B3}$ humano y un gen $J_{\kappa}1$, $J_{\kappa}2$, $J_{\kappa}3$, o $J_{\kappa}4$. En realizaciones particulares de la invención, el dominio variable de la cadena liviana es codificado por el gen $V_{\kappa}\text{O12/Jk3}$, $V_{\kappa}\text{L2/Jk3}$, $V_{\kappa}\text{L5/Jk3}$, $V_{\kappa}\text{L5/Jk4}$, $V_{\kappa}\text{A27/Jk4}$ o $V_{\kappa}\text{B3/Jk1}$.

[0129] En algunas realizaciones, el V_L del anticuerpo anti-M-CSF comprende una o más substituciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, el V_L del anticuerpo anti-M-CSF comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 substituciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, una o más de las substituciones de la línea germinal se encuentran en las regiones CDR de la cadena liviana. En algunas realizaciones, las substituciones de aminoácidos con relación a la línea germinal se encuentran en una o más posiciones iguales como las substituciones con relación a la línea germinal en cualquiera o varios de los V_L de los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. Por ejemplo, el V_L del anticuerpo anti-M-CSF puede contener una o más substituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal como las encontradas en el V_L del anticuerpo 88, y otras substituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal encontradas en el V_L del anticuerpo 252, que utiliza el mismo gen V_{κ} que el anticuerpo 88. En algunas

realizaciones, los cambios de aminoácidos se encuentran en una o más posiciones iguales, pero implican una mutación diferente a aquella encontrada en el anticuerpo de referencia.

[0130] En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos con relación a la línea germinal se encuentran en una o más posiciones iguales como los cambios en cualquiera de los V_L de los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1, pero los cambios pueden representar sustituciones con aminoácidos conservativos en tal posición (tales posiciones) en relación con el aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, si una posición particular en uno de estos anticuerpos se cambia en relación a la línea germinal y es glutamato, puede substituirse por aspartato en esta posición. Similarmente, si una sustitución de aminoácido en comparación con la línea germinal es serina, puede substituirse la serina por treonina en aquella posición. Sustituciones con aminoácidos conservativos se discuten *supra*.

[0131] En algunas realizaciones, la cadena liviana del anticuerpo anti-M-CSF humano comprende la misma secuencia de aminoácidos como la secuencia de aminoácidos del V_L del anticuerpo 252 (SEQ ID NO: 4), 88 (SEQ ID NO: 8), 100 (SEQ ID NO: 12), 3.8.3 (SEQ ID NO: 16), 2.7.3 (SEQ ID NO: 20), 1.120.1 (SEQ ID NO: 24), 9.14.4I (SEQ ID NO: 28), 8.10.3F (SEQ ID NO: 32), 9.7.2IF (SEQ ID NO: 36), 9.14.4 (SEQ ID NO: 28), 8.10.3 (SEQ ID NO: 44), 9.7.2 (SEQ ID NO: 48), 9.7.2C-Ser (SEQ ID NO: 52), 9.14.4C-Ser (SEQ ID NO: 56), 8.10.3C-Ser (SEQ ID NO: 60), 8.10.3-CG2 (SEQ ID NO: 60), 9.7.2-CG2 (SEQ ID NO: 52), 9.7.2-CG4 (SEQ ID NO: 52), 9.14.4-CG2 (SEQ ID NO: 56), 9.14.4-CG4 (SEQ ID NO: 56), 9.14.4-Ser (SEQ ID NO: 28), 9.7.2-Ser (SEQ ID NO: 48), 8.10.3-Ser (SEQ ID NO: 44), 8.10.3-CG4 (SEQ ID NO: 60), 8.10.3FG1 (SEQ ID NO: 32) ó 9.14.4G1 (SEQ ID NO: 28), ó dicha secuencia de aminoácidos tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de hasta 3 sustituciones con aminoácidos no conservativos. En algunas realizaciones, la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de cualquiera de los anticuerpos precedentes.

[0132] En algunas realizaciones, la cadena liviana del anticuerpo anti-M-CSF comprende al menos la CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena liviana de una secuencia de línea germinal o anticuerpo descrito en ésta. En otra realización, la cadena liviana puede comprender regiones CDR1, CDR2 o CDR3 de un anticuerpo seleccionado independientemente entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1, ó regiones CDR que tienen menos de 4 o menos de 3 sustituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos sustituciones con aminoácidos no conservativos. En otras realizaciones, la cadena liviana del anticuerpo anti-M-CSF comprende la CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena liviana, siendo seleccionada cada una de las mismas independientemente entre las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que tiene una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_L seleccionada entre SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60, ó codificada por una molécula de ácido nucleico que codifica la región V_L seleccionada entre SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 27, 31, 35, 43 ó 47. La cadena liviana del anticuerpo anti-M-CSF puede comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_L seleccionada entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1 ó SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60.

[0133] En algunas realizaciones, la cadena liviana comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1, ó dichas regiones CDR tienen cada una menos de 4 o menos de 3 sustituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos sustituciones

con aminoácidos no conservativos.

[0134] Con respecto a la cadena pesada, en algunas realizaciones, la región variable de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es codificada en parte por un gen V_H3-11, V_H3-23, V_H3-7, V_H1-18, V_H3-33, V_H3-48 humano y un gen J_H4, J_H6, J_H4b, ó J_H6b. En una realización particular de la invención, la región variable de la cadena pesada es codificada por el gen V_H3-11/D_H7-27/J_H6, V_H3-7/D_H6-13/J_H4, V_H3-23/D_H1-26/J_H4, V_H3-11/D_H7-27/J_H4, V_H3-33/D_H1-26/J_H4, V_H1-18/D_H4-23/J_H4, V_H3-11/D_H7-27/J_H4b, V_H3-48/D_H1-26/J_H4b, V_H3-11/D_H6-13/J_H6b, V_H3-11/D_H7-27/J_H4b, V_H3-48/D_H1-6/J_H4b, ó V_H3-11/D_H6-13/J_H6b. En algunas realizaciones, la V_H del anticuerpo anti-M-CSF contiene una o más sustituciones, delecciones o inserciones (adiciones) de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, la mutación (las mutaciones) son sustituciones no conservativas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, las mutaciones se encuentran en las regiones CDR de la cadena pesada. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos se efectúan en una o más posiciones iguales como las mutaciones con respecto a la línea germinal en cualquiera o varias de las V_H de los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En otras realizaciones, los cambios de aminoácidos se efectúan en una o más de las mismas posiciones, pero implican una mutación diferente de aquella en el anticuerpo de referencia.

[0135] En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable (V_H) del anticuerpo 252 (SEQ ID NO: 2), 88 (SEQ ID NO: 6), 100 (SEQ ID NO: 10), 3.8.3 (SEQ ID NO: 14), 2.7.3 (SEQ. ID NO: 18), 1.120.1 (SEQ. ID NO: 22), 9.14.4I (SEQ ID NO: 26), 8.10.3F (SEQ ID NO: 30), 9.7.2IF (SEQ ID NO: 34), 9.14.4 (SEQ ID NO: 38), 8.10.3 (SEQ ID NO: 30), 9.7.2 (SEQ ID NO: 46), 9.7.2C-Ser (SEQ ID NO: 50), 9.14.4C-Ser (SEQ ID NO: 54), 8.10.3C-Ser (SEQ ID NO: 58), 8.10.3-CG2 (SEQ ID NO: 62), 9.7.2-CG2 (SEQ ID NO: 66), 9.7.2-CG4 (SEQ ID NO: 70), 9.14.4-CG2 (SEQ ID NO: 74), 9.14.4-CG4 (SEQ ID NO: 78), 9.14.4-Ser (SEQ ID NO: 82), 9.7.2-Ser (SEQ ID NO: 86), 8.10.3-Ser (SEQ ID NO: 90), 8.10.3-CG4 (SEQ ID NO: 94), 8.10.3FG1 (SEQ ID NO: 98) ó 9.14.4G1 (SEQ ID NO: 102), ó dicha secuencia de aminoácidos tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de hasta 3 sustituciones con aminoácidos no conservativos. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de cualquiera de los anticuerpos precedentes.

[0136] En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1, ó dichas regiones CDR tienen cada una menos de 8, menos de 6, menos de 4 o menos de 3 sustituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos sustituciones con aminoácidos no conservativos.

[0137] En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende una CDR3 de línea germinal o anticuerpo, según lo descrito precedentemente, de una secuencia de anticuerpo como descrita en ésta, y puede comprender también las regiones CDR1 y CDR2 de una secuencia de línea germinal, o puede comprender una CDR1 y CDR2 de una secuencia de anticuerpo, cada una de las cuales es seleccionada independientemente de un anticuerpo que comprende una cadena pesada de un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En otra realización, la cadena pesada comprende una CDR3 de una secuencia de anticuerpo como descrita en ésta, y también puede comprender las regiones CDR1 y CDR2, cada una de las cuales es seleccionada independientemente de

una región CDR1 y CDR2 de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la región V_H seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102, ó codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región V_H seleccionada entre SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 25, 29, 33, 37, 45, 97 ó 101. En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana como expuesta precedentemente y una cadena pesada como expuesta precedentemente.

[0138] Un tipo de sustitución de aminoácidos que puede efectuarse es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que pueden ser químicamente reactivas, por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. En una realización, se efectúa una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede efectuarse en una región framework de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En otra realización, la cisteína es una región no canónica del anticuerpo.

[0139] Otro tipo de sustitución de aminoácidos que puede efectuarse consiste en remover cualquier sitio proteolítico potencial en el anticuerpo, particularmente aquellos sitios que se encuentran en una región CDR o framework de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y la eliminación de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de cualquier heterogeneidad en el producto de anticuerpo y aumentar de este modo su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácidos consiste en la eliminación de pares de asparagina-glicina, que forman sitios potenciales de deamidación, modificando uno o ambos residuos.

[0140] En algunas realizaciones, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-M-CSF de la invención no está presente (Lewis D.A., *et al.*, *Anal. Chem*, 66(5): 585-95 (1994)). En varias realizaciones de la invención, las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos anti-M-CSF pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

[0141] En un aspecto, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-M-CSF humanos y a las líneas celulares producidas por ingeniería genética para producirlos. La Tabla 1 enumera los identificadores de secuencia (SEQ ID NOS) de los ácidos nucleicos que codifican la región variable de las cadenas pesada y liviana y las secuencias de aminoácidos previstas para los anticuerpos monoclonales: 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3 y 9.7.2. Los anticuerpos variantes adicionales 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1 pueden producirse mediante métodos conocidos por los entendidos en el arte.

Tabla 1

ANTICUERPOS ANTI-M-CSF HUMANOS				
MAb	IDENTIFICADOR DE SECUENCIAS (SEQ ID NOS)			
	Longitud completa			
	Pesado		Liviano	
	DNA	Proteína	DNA	Proteína
252	1	2	3	4
88	5	6	7	8
100	9	10	11	12
3.8.3		14		16
2.7.3		18		20
1.120.1		22		24
9.14.4I	25	26	27	28
9.14.4	37	38	27	28
9.14.4C-Ser		54		56
9.14.4-CG2		74		56
9.14.4-CG4		78		56
9.14.4-Ser		82	27	28
9.14.4-G1	101	102	27	28
8.10.3F	29	30	31	32
8.10.3	29	30	43	44
8.10.3C-Ser		58		60
8.10.3-CG2		62		60

ANTICUERPOS ANTI-M-CSF HUMANOS				
MAb	IDENTIFICADOR DE SECUENCIAS (SEQ ID NOS)			
	Longitud completa			
	Pesado		Liviano	
	DNA	Proteína	DNA	Proteína
8.10.3-Ser		90	43	44
8.10.3-CG4		94		60
8.10.3FG1	97	98	31	32
9.7.2IF	33	34	35	36
9.7.2	45	46	47	48
9.7.2C-Ser		50		52
9.7.2-CG2		66		52
9.7.2-CG4		70		52
9.7.2-Ser		86	47	48

Clase y subclase de anticuerpos anti-M-CSF

[0142] La clase y subclase de anticuerpos anti-M-CSF puede determinarse mediante cualquier método conocido en el arte. En general, la clase y subclase de un anticuerpo puede determinarse usando anticuerpos específicos para una clase y subclase particular del anticuerpo. Tales anticuerpos están comercialmente disponibles. La clase y subclase pueden determinarse mediante ELISA, transferencia de Western, como así también otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase puede determinarse mediante la secuenciación del total o de una porción de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o livianas de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de varias clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

[0143] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-M-CSF es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-M-CSF puede ser una molécula IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-M-CSF es una subclase de IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo pertenece a la subclase IgG2 o IgG4. En otra realización preferida, el anticuerpo pertenece a la subclase IgG1.

Selectividad para especies y moléculas

[0144] En otro aspecto de la invención, los anticuerpos anti-M-CSF muestran ambas, selectividad para especies y selectividad molecular. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-M-CSF se liga a M-CSF humano, de mono cynomologus y de ratón. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, puede determinarse la selectividad para especies del anticuerpo anti-M-CSF usando métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad para especies usando transferencia de Western, FACS, ELISA, RIA, un ensayo de proliferación celular o un ensayo de ligadura al receptor de M-CSF. En una realización preferida, puede determinarse la selectividad para especies usando un ensayo de proliferación celular o ELISA.

[0145] En otra realización, el anticuerpo anti-M-CSF tiene una selectividad para M-CSF que es al menos 100 veces mayor que su selectividad para GM-/G-CSF. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-M-CSF no exhibe ninguna ligadura específica apreciable con otra proteína cualquiera distinta a M-CSF. Puede determinarse la selectividad del anticuerpo anti-M-CSF para M-CSF usando métodos bien conocidos en el arte, siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad usando transferencia de Western, FACS, ELISA o RIA.

Identificación de epítopes de M-CSF reconocidos por anticuerpos anti-M-CSF

[0146] La invención provee un anticuerpo monoclonal anti-M-CSF humano que se liga a M-CSF y compite con, compite en forma cruzada con y/o se liga al mismo epítopo y/o se liga a M-CSF con la misma K_D como (a) un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1; (b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70,

74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102; (c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60; (d) un anticuerpo que comprende ambas, una región variable de la cadena pesada como la definida en (b) y una región variable de la cadena liviana como la definida en (c).

[0147] Puede determinarse si un anticuerpo se liga al mismo epítoto, compite para ligarse con, compite en forma cruzada para ligarse con o tiene la misma K_D como un anticuerpo anti-M-CSF usando métodos conocidos en el arte. En una realización, se permite que el anticuerpo anti-M-CSF de la invención se ligue a M-CSF bajo condiciones de saturación y luego se mide la capacidad del anticuerpo de ensayo para ligarse a M-CSF. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de ligarse a M-CSF simultáneamente con el anticuerpo anti-M-CSF, entonces el anticuerpo de ensayo se liga a un epítoto diferente que el anticuerpo anti-M-CSF. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de ligarse a M-CSF simultáneamente, entonces el anticuerpo de ensayo se liga al mismo epítoto, a un epítoto solapado o a un epítoto que se encuentra muy cerca del epítoto ligado por el anticuerpo anti-M-CSF humano. Este experimento puede realizarse usando ELISA, RIA o FACS. En una realización preferida, el experimento se realiza usando BIACORE™.

Afinidad de ligadura de anticuerpos anti-M-CSF dirigidos a M-CSF

[0148] En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-M-CSF se ligan a M-CSF con elevada afinidad. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-M-CSF se liga con M-CSF con una K_D de 1×10^{-7} M o menor. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo se liga a M-CSF con una K_D de 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M o menor. En ciertas realizaciones, la K_D es de 1 pM a 500 pM. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 500 pM y 1 μ M. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 1 μ M y 100 nM. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 100 mM y 10 nM. En una realización aún más preferida, el anticuerpo se liga a M-CSF con substancialmente la misma K_D como un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga a M-CSF con substancialmente la misma K_D como un anticuerpo que comprende una CDR2 de una cadena liviana y/o una CDR3 de una cadena pesada de un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En aún otra realización preferida, el anticuerpo se liga a M-CSF con substancialmente la misma K_D como un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102, o que comprende una región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga a M-CSF con substancialmente la misma K_D como un anticuerpo que comprende una CDR2, y puede comprender opcionalmente una CDR1 y/o CDR3, de una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de la región V_L de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60, ó que comprende una CDR3, y puede comprender opcionalmente una CDR1 y/o CDR2, de una región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de la región V_H de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102.

[0149] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-M-CSF tiene una baja velocidad de disociación. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-M-CSF tiene una k_{off} de $2,0 \times 10^{-4}$ s⁻¹ o menor. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo se liga a M-CSF con una k_{off} de $2,0 \times 10^{-5}$ o una k_{off} de $2,0 \times 10^{-6}$ s⁻¹ o menor. En algunas realizaciones, la k_{off} es substancialmente la misma como la de un anticuerpo descrito en ésta, tal como un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En algunas realizaciones, el anticuerpo se liga a M-CSF con

substantialmente la misma k_{off} como un anticuerpo que comprende (a) una CDR3, y puede comprender opcionalmente una CDR1 y/o CDR2, de una cadena pesada de un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1; o (b) una CDR2, y puede comprender opcionalmente una CDR1 y/o CDR3, de una cadena liviana de un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En algunas realizaciones, el anticuerpo se liga con M-CSF con substantially la misma k_{off} como un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102; o que comprende una región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga a M-CSF con substantially la misma k_{off} como un anticuerpo que comprende una CDR2, y puede comprender opcionalmente una CDR1 y/o CDR3, de una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60; ó una CDR3, y puede comprender opcionalmente una CDR1 y/o CDR2, de una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102.

[0150] La afinidad de ligadura y la velocidad de disociación de un anticuerpo anti-M-CSF con un M-CSF pueden determinarse mediante métodos conocidos por el arte. La afinidad de ligadura puede medirse mediante ensayos competitivos ELISAs, RIAs, resonancia en la superficie de un plasmón (N. del T.: plasmón = una placa metálica delgada que se recubre con la sustancia a determinar) (por ejemplo, usando la tecnología BIACORE™). La velocidad de disociación puede medirse mediante resonancia en la superficie de un plasmón (surface plasmon resonance). Preferentemente, la afinidad de ligadura y la velocidad de disociación se miden mediante resonancia en la superficie de un plasmón. Más preferentemente, la afinidad de ligadura y la velocidad de disociación se miden usando la tecnología BIACORE™. El Ejemplo VI ejemplifica un método para determinar constantes de afinidad de anticuerpos monoclonales anti-M-CSF mediante tecnología BIACORE™.

Inhibición de la actividad M-CSF mediante un anticuerpo anti-M-CSF

Inhibición de la ligadura de M-CSF a *c-fms*

[0151] En otra realización, la invención provee un anticuerpo anti-M-CSF que inhibe la ligadura de un M-CSF al receptor *c-fms* y bloquea o previene la activación de *c-fms*. En una realización preferida, el M-CSF es un humano. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-M-CSF es un anticuerpo humano. La IC_{50} puede medirse mediante ELISA, RIA y ensayos basados en células tales como un ensayo de proliferación celular, un ensayo de cambio de forma de monocitos de la sangre o un ensayo de inhibición de ligadura al receptor. En una realización, el anticuerpo o una porción del mismo inhibe la proliferación celular con una IC_{50} no mayor de $8,0 \times 10^{-7}$ M, preferentemente no mayor de 3×10^{-7} M, o más preferentemente no mayor de 8×10^{-8} M, según lo medido mediante un ensayo de proliferación celular. En otra realización, la IC_{50} medida mediante un ensayo de cambio de forma de monocitos no es mayor de 2×10^{-6} M, preferentemente no mayor de $9,0 \times 10^{-7}$ M, o más preferentemente no mayor de 9×10^{-8} M. En otra realización preferida, la IC_{50} medida por un ensayo de ligadura al receptor no es mayor de 2×10^{-6} M, preferentemente no mayor de $8,0 \times 10^{-7}$ M, o más preferentemente no mayor de $7,0 \times 10^{-8}$ M. Los ejemplos III, IV y V ejemplifican varios tipos de ensayos.

[0152] En otro aspecto, los anticuerpos anti-M-CSF de la invención inhiben la proliferación celular de monocitos/macrófagos en respuesta a un M-CSF en al menos 20%, más preferentemente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 100% en comparación con la proliferación celular en la ausencia del anticuerpo.

Métodos para producir anticuerpos y líneas celulares que producen anticuerpos

Inmunización

[0153] En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos se producen mediante la

inmunización de un animal no humano que comprende en su genoma algunos o todos los loci de la cadena pesada y cadena liviana de la inmunoglobulina humana con un antígeno M-CSF. En una realización preferida, el animal no humano es un animal XENOMOUSE™ (Abgenix Inc., Fremont, CA). Otro animal no humano que puede usarse es un ratón transgénico producido por Medarex (Medarex, Inc., Princeton, NJ).

[0154] Los ratones XENOMOUSE™ son cepas de ratón producidas por ingeniería genética que comprenden grandes fragmentos de loci de cadenas pesadas y cadenas livianas de la inmunoglobulina humana y son deficientes para la producción de anticuerpos de ratón. Vea, por ejemplo, Green *et al.*, *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) y Patentes U.S. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 y 6.150.584. Vea también WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 y WO 00/037504.

[0155] En otro aspecto, la invención provee un método para fabricar anticuerpos anti-M-CSF a partir de animales no ratón, no humanos mediante la inmunización de animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana con un antígeno M-CSF. Tales animales pueden producirse usando los métodos descritos en los documentos arriba citados. Los métodos revelados en estos documentos pueden ser modificados según lo descrito en la Patente U.S. 5.994.619. La patente U.S. 5.994.619 describe métodos para producir nuevas células y líneas celulares de masa celular interior (CICM) cultivadas, derivadas de cerdos y vacas, y células CICM transgénicas en las cuales ha sido insertado DNA heterólogo. Las células CICM transgénicas pueden usarse para producir embriones, fetos y progenie transgénicos clonados. La patente '619 también describe los métodos para producir animales transgénicos capaces de transmitir el DNA heterólogo a su progenie. En realizaciones preferidas, los animales no humanos son ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos.

[0156] Los ratones XENOMOUSE™ producen un repertorio de anticuerpos completamente humanos similares a los de humanos adultos y generan anticuerpos humanos antígeno-específicos. En algunas realizaciones, los ratones XENOMOUSE™ contienen aproximadamente 80% del repertorio de genes V del anticuerpo humano, mediante la introducción de fragmentos del cromosoma artificial de levadura (YAC) con configuración de la línea germinal del tamaño megabase de los loci de cadena pesada humana y los loci de cadena liviana kappa. En otras realizaciones, los ratones XENOMOUSE™ contienen además aproximadamente todo el locus de la cadena liviana lambda. Vea Mendez *et al.*, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), y WO 98/24893, cuyas revelaciones están incorporadas en ésta por referencia.

[0157] En algunas realizaciones, los animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulina humana son animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulina humana. En el enfoque de minilocus, se mimetiza un locus de Ig exógena mediante la inclusión de genes individuales del locus de la Ig. De este modo, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, un dominio constante mu y un segundo dominio constante (preferentemente un dominio constante gamma) son conformados en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe, *inter alia*, en las Patentes U.S. Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215 y 5.643.763, incorporadas en ésta por referencia.

[0158] En otro aspecto, la invención provee un método para fabricar anticuerpos anti-M-CSF humanizados. En algunas realizaciones, animales no humanos se inmunizan con un antígeno M-CSF, según lo descrito más abajo, bajo condiciones que permiten la producción de anticuerpos. Las células que producen anticuerpos se aíslan de los animales, se fusionan con mielomas para producir hibridomas, y se aíslan ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo anti-M-CSF de interés. Subsecuentemente, estos ácidos nucleicos se producen mediante ingeniería genética usando técnicas conocidas por los entendidos en el arte y descritas más abajo, con el fin de reducir la cantidad de secuencias no humanas, es decir, para humanizar el anticuerpo con el fin de reducir la respuesta inmune en humanos.

[0159] En algunas realizaciones, el antígeno M-CSF es un M-CSF aislado y/o purificado. En una realización preferida, el antígeno M-CSF es un M-CSF humano. En

algunas realizaciones, el antígeno M-CSF es un fragmento de M-CSF. En algunas realizaciones, el fragmento M-CSF es el dominio extracelular de M-CSF. En algunas realizaciones, el fragmento M-CSF comprende al menos un epítipo de M-CSF. En otras realizaciones, el antígeno M-CSF es una célula que expresa o sobreexpresa M-CSF o un fragmento inmunogénico del mismo sobre su superficie. En algunas realizaciones, el antígeno M-CSF es una proteína de fusión de M-CSF. El M-CSF puede ser purificado a partir de fuentes naturales usando técnicas conocidas. El M-CSF recombinante está disponible comercialmente.

[0160] La inmunización de animales puede efectuarse mediante cualquier método conocido en el arte. Veá, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Métodos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno y caballos son bien conocidos en el arte. Veá, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*, y Patente U.S. 5.994.619. En una realización preferida, el antígeno M-CSF se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Adyuvantes típicos incluyen al adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (didéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida, secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancia que estimulan al hospedante para segregar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferentemente, cuando se administra un polipéptido, el plan de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido repartidas en varias semanas. El Ejemplo 1 ejemplifica un método para producir anticuerpos monoclonales anti-M-CSF en ratones XENOMOUSE™.

Producción de anticuerpos y líneas celulares que producen anticuerpos

[0161] Después de la inmunización de un animal con un antígeno M-CSF, pueden obtenerse del animal anticuerpos y/o células que producen anticuerpos. En algunas realizaciones, se obtiene del animal un suero que contiene el anticuerpo anti-M-CSF desangrando o sacrificando al animal. El suero puede usarse tal como se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del mismo o pueden purificarse anticuerpos anti-M-CSF del suero.

[0162] En algunas realizaciones, se preparan líneas celulares inmortalizadas que producen anticuerpos a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y se immortalizan células B del nodo linfático y/o bazo. Los métodos para immortalizar células incluyen, pero no están limitados a, transfectar las células con oncogenes, infectarlas con un virus oncogénico, cultivarlas bajo condiciones selectivas para células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionarlas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor de tumores. Veá, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. Cuando se usa fusión con células de mieloma, las células de mieloma preferentemente no segregar polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretoria). Las células inmortalizadas se rastrean usando M-CSF, una porción del mismo o una célula que expresa M-CSF. En una realización preferida, la selección inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de rastreo con ELISA se provee en WO 00/37504, incorporado en ésta por referencia.

[0163] Las células que producen anticuerpos anti-M-CSF, por ejemplo, hibridomas, son seleccionadas, clonadas y rastreadas adicionalmente para obtener características deseables, incluyendo crecimiento robusto, elevada producción de anticuerpos y características deseables del anticuerpo, según lo discutido más abajo. Los hibridomas pueden expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en un cultivo celular *in vitro*. Métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los entendidos en el arte.

[0164] En una realización preferida, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana, y las células B del bazo se fusionan con una línea celular de mieloma de la misma especie del animal no humano. En una realización más preferida, el animal inmunizado es un animal XENOMOUSE™ y la línea celular del mieloma es un mieloma de ratón no secretorio. En una realización aún más preferida, la línea celular del mieloma es P3-X63-AG8-653. Veá, por ejemplo, Ejemplo 1.

[0165] Por lo tanto, en una realización, la invención provee métodos para producir una

línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento del mismo dirigido a M-CSF, métodos que comprenden (a) inmunizar un animal transgénico no humano descrito en ésta con M-CSF, una porción de M-CSF o una célula o tejido que expresa M-CSF; (b) esperar que el animal transgénico tenga una respuesta inmune a M-CSF; (c) aislar linfocitos B de un animal transgénico; (d) immortalizar los linfocitos B; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de los linfocitos B immortalizados; y (f) rastrear los linfocitos B immortalizados para identificar un anticuerpo dirigido a M-CSF.

[0166] En otro aspecto, la invención provee hibridomas que producen un anticuerpo anti-M-CSF humano. En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, según lo descrito anteriormente. En otras realizaciones, los hibridomas se producen en una especie no humana, no ratón, tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacunos o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos.

[0167] En otra realización preferida, se inmuniza un animal transgénico con M-CSF, se aíslan células primarias, por ejemplo, células del bazo o de sangre periférica del animal transgénico inmunizado y se identifican células individuales que producen anticuerpos específicos para el antígeno deseado. De cada célula individual se aísla mRNA poliadenilado y se realiza reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con transcripción inversa, usando cebadores sentido que hibridan con secuencias de la región variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayoría o todas las regiones FR1 de genes del dominio variable de cadena pesada y liviana humana, y cebadores antisentido que hibridan con secuencias de región constante o flanqueante. Luego, cDNAs de las regiones variables de cadena pesada y liviana se clonan y se expresan en cualquier célula hospedante adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de la inmunoglobulina respectiva, tales como la cadena pesada y dominios constantes κ ó λ . Veá Babcook, J.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48, 1996, incorporados en ésta por referencia. Luego, los anticuerpos anti-M-CSF pueden identificarse y aislarse según lo descrito en ésta.

[0168] En otra realización, pueden usarse técnicas de exhibición en fagos para proveer bibliotecas que contienen un repertorio de anticuerpos con afinidades variadas para M-CSF. Para la producción de tales repertorios, no es necesario immortalizar las células B del animal inmunizado. Más bien, las células B primarias pueden usarse directamente como fuente de DNA. La mezcla de cDNAs obtenida a partir de células B, por ejemplo, derivada de bazos, se usa para preparar una biblioteca de expresión, por ejemplo, una biblioteca de exhibición en fagos transfectada en *E. coli*. Las células resultantes se ensayan por inmunoreactividad a M-CSF. Las técnicas para la identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad a partir de tales bibliotecas se describen en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 13:3245-3260 (1994); Nissim *et al.*, *ibid*, pp. 692-698 y por Griffiths *et al.*, *ibid*, 12:725-734. Finalmente, se identifican clones de la biblioteca que producen afinidades de ligadura de una magnitud deseada para el antígeno y se recupera el DNA que codifica el producto responsable para tal ligadura, DNA que se manipula para expresión recombinante estándar. También pueden construirse bibliotecas de exhibición en fagos usando secuencias nucleotídicas previamente manipuladas y rastreadas de un modo similar. Generalmente, los cDNAs que codifican cadenas pesadas y livianas se proveen en forma independiente o ligados para formar análogos del gen Fv para la producción en la biblioteca de fagos.

[0169] Luego, la biblioteca de fagos se rastrea por los anticuerpos con las afinidades mayores para M-CSF y se recupera el material genético del clon apropiado. Ciclos adicionales de rastreo pueden aumentar la afinidad del anticuerpo original aislado.

[0170] En otro aspecto, la invención provee hibridomas que producen un anticuerpo anti-M-CSF humano. En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, según lo descrito anteriormente. En otras realizaciones, los hibridomas se producen en una especie no humana, no ratón, tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacunos o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos.

Ácidos nucleicos, vectores, células hospedantes y métodos recombinantes para fabricar anticuerpos

Ácidos nucleicos

[0171] La presente invención también comprende moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-M-CSF. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican una cadena pesada y una cadena liviana de una inmunoglobulina

anti-M-CSF. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y una cadena liviana de una inmunoglobulina anti-M-CSF. En una realización, el ácido nucleico codifica un anticuerpo anti-M-CSF de la invención.

[0172] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena liviana comprende un gen V_L L5, O12, L2, B3, A27 humano y un gen Jk1, Jk2, Jk3 o Jk4.

[0173] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos V_L que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones con aminoácidos conservativos y/o 1, 2 ó 3 sustituciones no conservativas en comparación con la secuencia de la línea germinal. Las sustituciones pueden encontrarse en las regiones CDR, las regiones framework o en el dominio constante.

[0174] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_L que comprende una o más variantes en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a las variaciones encontradas en la V_L de uno de los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3CG2, 9.7.2CG2, 9.7.2CG4, 9.14.4CG2, 9.14.4CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1.

[0175] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica al menos tres mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal encontrada en la V_L de uno de los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4, 8.10.3, ó 9.7.2.

[0176] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos V_L del anticuerpo monoclonal 252 (SEQ ID NO: 4), 88 (SEQ ID NO: 8), 100 (SEQ ID NO: 12), 3.8.3 (SEQ ID NO: 16), 2.7.3 (SEQ ID NO: 20), 1.120.1 (SEQ ID NO: 24), 9.14.4I (SEQ ID NO: 28), 8.10.3F (SEQ ID NO: 32), 9.7.2IF (SEQ ID NO: 36), 9.14.4 (SEQ ID NO: 28), 8.10.3 (SEQ ID NO: 44), 9.7.2 (SEQ ID NO: 48), 9.7.2C-Ser (SEQ ID NO: 52), 9.14.4C-Ser (SEQ ID NO: 56), 8.10.3C-Ser (SEQ ID NO: 60), 8.10.3CG2 (SEQ ID NO: 60), 9.7.2CG2 (SEQ ID NO: 52), 9.7.2CG4 (SEQ ID NO: 52), 9.14.4CG2 (SEQ ID NO: 56), 9.14.4CG4 (SEQ ID NO: 56), 9.14.4-Ser (SEQ ID NO: 28), 9.7.2-Ser (SEQ ID NO: 48), 8.10.3-Ser (SEQ ID NO: 44), 8.10.3CG4 (SEQ ID NO: 60), 8.10.3FG1 (SEQ ID NO: 32) ó 9.14.4G1 (SEQ ID NO: 28), o una porción del mismo. En algunas realizaciones, dicha porción comprende al menos la región CDR2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de las CDRs de la cadena liviana de dicho anticuerpo. En algunas realizaciones, dicha porción es una porción contigua que comprende CDR1-CDR3.

[0177] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de una de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia nucleotídica de la cadena liviana de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 27, 31, 35, 43 ó 47, o una porción de la misma.

[0178] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_L que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos V_L mostrada en la Figura 1 o a una secuencia de aminoácidos V_L de cualquiera de los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3CG2, 9.7.2CG2, 9.7.2CG4, 9.14.4CG2, 9.14.4CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1, o a una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones altamente exigentes, tales como aquellas descritas precedentemente, con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena liviana de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60 ó que tiene la secuencia de ácido nucleico de la cadena liviana de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 27, 31, 35, 43 ó 47.

[0179] En otra realización, el ácido nucleico codifica una cadena liviana de longitud completa de un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1, o una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60 y una región constante de una cadena liviana, o una cadena liviana que comprende una mutación. Además, el ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de cadena liviana de SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 27, 31, 35, 43 ó 47 y la secuencia nucleotídica que codifica una región constante de una cadena liviana, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena liviana que comprende una mutación.

[0180] En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico codifica el dominio variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia del gen V_H 1-18, 3-33, 3-11, 3-23, 3-48 ó 3-7 humano o una secuencia derivada del mismo. En varias realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende un gen V_H 1-18 humano, un gen D_H 4-23 humano y un gen J_H 4 humano; un gen V_H 3-33 humano, un gen D_H 1-26 humano y un gen J_H 4 humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D_H 7-27 humano y un gen J_H 4 humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D_H 7-27 humano y un gen J_H 6 humano; un gen V_H 3-23 humano, un gen D_H 1-26 humano y un gen J_H 4 humano; un gen V_H 3-7 humano, un gen D_H 6-13 humano y un gen J_H 4 humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D_H 7-27 humano, y un gen J_H 4b humano; un gen V_H 3-48 humano, un gen D_H 1-26 humano, y un gen J_H 4b humano; un gen V_H 3-11 humano, un gen D_H 6-13 humano, y un gen J_H 6b humano, o una secuencia derivada de los genes humanos.

[0181] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de los genes V, D o J humanos. En algunas realizaciones, dichas mutaciones se encuentran en la región V_H . En algunas realizaciones, dichas mutaciones se encuentran en las regiones CDR.

[0182] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una o más mutaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal que son idénticas a mutaciones de aminoácidos encontradas en la V_H del anticuerpo monoclonal 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica al menos tres mutaciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de la línea germinal que son idénticas a al menos tres mutaciones de aminoácidos encontradas en uno de los anticuerpos monoclonales arriba enumerados.

[0183] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos una porción de la secuencia de aminoácidos V_H del anticuerpo 252 (SEQ ID NO: 2), 88 (SEQ ID NO: 6), 100 (SEQ ID NO: 10), 3.8.3 (SEQ ID NO: 14), 2.7.3 (SEQ ID NO: 18), 1.120.1 (SEQ ID NO: 22), 9.14.4I (SEQ ID NO: 26), 8.10.3F (SEQ ID NO: 30), 9.7.2IF (SEQ ID NO: 34), 9.14.4 (SEQ ID NO: 38), 8.10.3 (SEQ ID NO: 30), 9.7.2 (SEQ ID NO: 46), 9.7.2C-Ser (SEQ ID NO: 50), 9.14.4C-Ser (SEQ ID NO: 54), 8.10.3C-Ser (SEQ ID NO: 58), 8.10.3-CG2 (SEQ ID NO: 60), 9.7.2-CG2 (SEQ ID NO: 66), 9.7.2-CG4 (SEQ ID NO: 70), 9.14.4-CG2 (SEQ ID NO: 74), 9.14.4-CG4 (SEQ ID NO: 78), 9.14.4-Ser (SEQ ID NO: 82), 9.7.2-Ser (SEQ ID NO: 86), 8.10.3-Ser (SEQ ID NO: 90), 8.10.3-CG4 (SEQ ID NO: 94), 8.10.3FG1 (SEQ ID NO: 98) ó 9.14.4G1 (SEQ ID NO: 102), o dicha secuencia que tiene mutaciones de aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos substituciones con aminoácidos no conservativos. En varias realizaciones, la secuencia codifica una o más regiones CDR, preferentemente una región CDR3, todas las tres regiones CDR, una porción contigua incluyendo CDR1-CDR3 o la región V_H entera.

[0184] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica de cadena pesada que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una porción de la secuencia nucleotídica de cadena pesada

de SEQ ID NO: 1, 5, 9, 25, 29, 33, 37, 45, 97 ó 101. En algunas realizaciones, dicha porción codifica la región V_H , una región CDR3, todas las tres regiones CDR, o una región contigua que incluye CDR1-CDR3.

[0185] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_H que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ó 99% idéntica a las secuencias de aminoácidos V_H mostradas en la Figura 4 ó a una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones altamente exigentes, tales como aquellas descritas precedentemente, con una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102, o que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 25, 29, 33, 37, 45, 97 ó 101.

[0186] En otra realización, el ácido nucleico codifica una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.41, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1, o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102 y una región constante de una cadena pesada, o una cadena pesada que comprende una mutación. Además, el ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de cadena pesada de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 25, 29, 33, 37, 45, 97 ó 101 y una secuencia nucleotídica que codifica una región constante de una cadena liviana, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende una mutación.

[0187] Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o cadena liviana entera de un anticuerpo anti-M-CSF o porciones de la misma puede aislarse de cualquier fuente que produce tal anticuerpo. En varias realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de una célula B aislada de un animal inmunizado con M-CSF o de una célula inmortalizada derivada de una célula B tal que expresa un anticuerpo anti-M-CSF. Métodos para aislar mRNA que codifica un anticuerpo son bien conocidos por el arte. Vea, por ejemplo, Sambrook *et al.* El mRNA puede usarse para producir cDNA a ser utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la clonación con cDNA de genes del anticuerpo. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico se aísla de un hibridoma que tiene como uno de sus compañeros de fusión una célula de un animal transgénico no humano que produce una inmunoglobulina humana. En una realización aún más preferida, la célula que produce inmunoglobulina humana se aísla de un animal XENOMOUSE™. En otra realización, la célula que produce inmunoglobulina humana es de un animal transgénico no humano, no ratón, según lo descrito precedentemente. En otra realización, el ácido nucleico se aísla de un animal no transgénico, no humano. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de un animal no humano, no transgénico pueden usarse, por ejemplo, para anticuerpos humanizados.

[0188] En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-M-CSF de la invención puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un dominio V_H de la invención unido en el marco de lectura con una secuencia nucleotídica que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. Similarmente, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena liviana de un anticuerpo anti-M-CSF de la invención puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un dominio V_L de la invención unida en el marco de lectura con una secuencia nucleotídica que codifica un dominio constante de cadena liviana de cualquier fuente.

[0189] En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesadas (V_H) y/o livianas (V_L) se "convierten" en genes del anticuerpo de longitud completa. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes del anticuerpo de longitud completa mediante la inserción en un vector de expresión que ya codifica dominios constantes de cadena pesada (C_H) o dominios constantes de cadena liviana (C_L), respectivamente, de modo que el segmento V_H se liga operativamente al segmento

(a los segmentos) C_H dentro del vector, y el segmento V_L se liga operativamente al segmento C_L dentro del vector. En otra realización, moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H y/o V_L se convierten en genes del anticuerpo de longitud completa, enlazando, por ejemplo, ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica dominios V_H y/o V_L con una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio C_H y/o C_L , usando técnicas estándar de biología molecular. El arte conoce secuencias de ácido nucleico de genes del dominio constante de cadenas pesadas y livianas de la inmunoglobulina humana. Vea, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5° Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Luego, moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o livianas de longitud completa pueden ser expresadas por una célula en la cual han sido introducidas y el anticuerpo anti-M-CSF puede ser aislado.

[0190] Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar recombinantemente grandes cantidades de anticuerpos anti-M-CSF. Las moléculas de ácido nucleico también pueden usarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena simple, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, según lo descrito más abajo. Si las moléculas de ácido nucleico se derivan de un animal no humano, no transgénico, las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la humanización de anticuerpos, también según lo descrito más abajo.

[0191] En otra realización, se usa una molécula de ácido nucleico de la invención como sonda o cebador PCR para una secuencia específica del anticuerpo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede usarse como sonda en métodos diagnósticos o como cebador PCR para amplificar regiones de DNA que pueden ser usados, inter alia, para aislar moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican dominios variables de anticuerpos anti-M-CSF. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pertenecen a regiones altamente variables de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo de interés. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos codifican el total o una parte de una o más de las CDRs del anticuerpo 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3 ó 1.120.1 o variantes del mismo descritas en ésta.

Vectores

[0192] La invención provee vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-M-CSF de la invención o una porción que liga antígeno del mismo. La invención también provee vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena liviana de tales anticuerpos o porción que liga antígeno de los mismos. La invención provee además vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos y sondas de los mismos.

[0193] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-M-CSF o las porciones que ligan antígeno de la invención se expresan insertando DNAs que codifican cadenas livianas y pesadas de longitud parcial o completa, obtenidos según lo descrito precedentemente, en vectores de expresión, de modo que los genes se ligan operativamente con secuencias de control de expresión necesarias tales como secuencias de control de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas tales como virus del mosaico de coliflor, virus del mosaico de tabaco, cósmidos, YACs, episomas derivados de EBV y similares. El gen del anticuerpo es ligado dentro de un vector de modo que secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector pueden ejercer su función de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen de modo que sean compatibles con la célula hospedante usada para la expresión. El gen de la cadena liviana del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En una realización preferida, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y el vector, o ligadura con formación de extremos romos si no existen sitios de restricción).

[0194] Un vector conveniente es un vector que codifica una secuencia C_H o C_L funcionalmente completa de la inmunoglobulina humana, con sitios de restricción

apropiados contruídos por métodos de ingeniería genética de modo que cualquier secuencia V_H o V_L puede ser insertada y expresada fácilmente, según lo descrito precedentemente. En tales vectores, el corte y empalme se produce usualmente entre el sitio dador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede el dominio C humano, y también se produce en las regiones de corte y empalme que existen dentro de los exones del C_H humano. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosomales nativos corriente abajo de las regiones de codificación. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo por una célula hospedante. El gen de la cadena del anticuerpo puede ser clonado en el vector de modo que el péptido señal sea ligado en el marco de lectura con el terminal amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no sea una inmunoglobulina).

[0195] Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedante. Será apreciado por los entendidos en el arte que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias regulatorias, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante a ser transformada, el nivel de expresión deseado de la proteína, etc. Secuencias regulatorias preferidas para la expresión en células hospedantes mamíferas incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células mamíferas, tales como promotores y/o intensificadores derivados de secuencias largas terminales repetidas (LTRs) de retrovirus, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/intensificador de CMV), Virus Simian 40 (SV40) (tal como el promotor/intensificador de SV40, adenovirus, (por ejemplo, el promotor principal tardío de adenovirus (adenovirus major late promoter = AdMLP)), polioma y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores de inmunoglobulina natural y actina. Para una descripción adicional de elementos regulatorios virales y secuencias de los mismos vea, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615. Los métodos para expresar anticuerpos en plantas, incluyendo una descripción de promotores y vectores, como así también los métodos para la transformación de plantas son conocidos por el arte. Vea, por ejemplo, la Patente U.S. 6.517.529, incorporada en ésta por referencia. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos por el arte.

[0196] Además de genes de cadenas de anticuerpos y de secuencias regulatorias, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedantes (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de las células hospedantes en las cuales se introdujo el vector (vea, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador de selección confiere resistencia a drogas, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedante en la cual se introdujo el vector. Genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (a ser usado en células hospedantes dhfr con selección/amplificación de metotrexato), el gen de resistencia a neomicina (para la selección de G418) y el gen glutamato sintetasa.

Células hospedantes no hibridoma y métodos recombinantes para producir proteínas

[0197] Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-M-CSF y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la transfección de una célula hospedante mamífera, vegetal, bacteriana o de levadura adecuada. La transformación puede realizarse mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedante. Métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células mamíferas son bien conocidos por el arte e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación del (de los) polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del DNA en núcleos. Además, moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células mamíferas mediante vectores virales. Métodos para la transformación de células son bien conocidos por el arte. Vea,

por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455 (patentes que son incorporadas en ésta por referencia). Métodos de transformación de células vegetales son bien conocidos por el arte, incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por *agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Métodos para transformar células bacterianas y de levadura también son bien conocidos por el arte.

[0198] Líneas celulares mamíferas disponibles como hospedantes para la expresión son bien conocidas por el arte e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la colección American Type Culture Collection (ATCC). Estas líneas celulares incluyen, *inter alia*, células del ovario del hamster chino (Chinese hamster ovary (CHO) cells), células NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de la cría de hamster (baby hamster kidney (BHK) cells), células de riñón de mono verde africano (COS), células del carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y un número de otras líneas celulares. Líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando aquellas líneas celulares que tienen elevados niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insectos, tales como células Sf9. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células hospedantes mamíferas, los anticuerpos son producidos cultivando las células hospedantes durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedantes o, más preferentemente, mediante la secreción del anticuerpo en el medio del cultivo en el cual se cultivan las células hospedantes. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar para la purificación de proteínas. Células vegetales hospedantes incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua (duckweed), maíz, trigo, papa, etc. Células hospedantes bacterianas incluyen las especies *E. coli* y *Streptomyces*. Células hospedantes de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

[0199] Además, la expresión de anticuerpos de la invención (u otros grupos funcionales de los mismos) de líneas celulares de producción puede intensificarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión de genes con glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para aumentar la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS se discute total o parcialmente en conexión con las Patentes Europeas Nos. 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la Solicitud de Patente Europea No. 89303964.4.

[0200] Es posible que anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tendrán una glicosilación diferente entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico provistas en ésta, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en ésta, forman parte de la presente invención, independientemente del estado de glicosilación o estructura o modificación de los anticuerpos.

Animales y plantas transgénicos

[0201] Los anticuerpos anti-M-CSF de la invención también pueden producirse transgénicamente mediante la generación de un mamífero o planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y liviana de la inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable del mismo. En conexión con la producción transgénica en mamíferos, anticuerpos anti-M-CSF pueden producirse en, y recuperarse de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Veá, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957. En algunas realizaciones, animales no humanos transgénicos que comprenden loci de inmunoglobulina humana se inmunizan con M-CSF o una porción inmunogénica del mismo, según lo descrito precedentemente. Métodos para producir anticuerpos en plantas, levaduras u hongos/algas se describen, por ejemplo, en las patentes US 6.046.037 y US 5.959.177.

[0202] En algunas realizaciones, animales no humanos transgénicos o plantas son producidos mediante la introducción de uno o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-M-CSF de la invención en el animal o planta mediante técnicas transgénicas estándar. Veá Hogan y la Patente de Estados Unidos 6.417.429, *supra*. Las células transgénicas usadas para hacer el animal transgénico pueden ser células madre embrionarias o células somáticas. Los organismos transgénicos no humanos pueden ser quiméricos, heterocigotas no quiméricos y homocigotas no quiméricos. Veá, por ejemplo,

Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson *et al.*, *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); y Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). En algunas realizaciones, los animales transgénicos no humanos tienen una ruptura dirigida y reemplazo mediante una construcción dirigida a un objetivo que codifica una cadena pesada y/o una cadena liviana de interés. En una realización preferida, los animales transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y livianas que se ligan específicamente a M-CSF, preferentemente M-CSF humano. En algunas realizaciones, los animales transgénicos comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-M-CSF pueden fabricarse en cualquier animal transgénico. En una realización preferida, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. Los animales transgénicos no humanos expresan dichos polipéptidos codificados en sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco y otros fluidos corporales.

Bibliotecas de exhibición en fagos

[0203] La invención provee un método para producir un anticuerpo anti-M-CSF o una porción que liga antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, rastrear la biblioteca con M-CSF o una porción del mismo, aislar el fago que liga M-CSF y obtener el anticuerpo del fago. A modo de ejemplo, un método para preparar la biblioteca de anticuerpos para uso en técnicas de exhibición en fagos comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que contiene loci de inmunoglobulina humana con M-CSF o una porción antigénica del mismo para crear una respuesta inmune, extraer células que producen anticuerpos del animal inmunizado; aislar de las células extraídas RNA, someter el RNA a transcripción inversa para producir cDNA, amplificar el cDNA usando un cebador, e insertar el cDNA en un vector de exhibición en fagos, de modo que los anticuerpos sean expresados en el fago. De este modo pueden obtenerse anticuerpos anti-M-CSF recombinantes de la invención.

[0204] Los anticuerpos recombinantes anti-M-CSF de la invención pueden aislarse rastreando una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes. Preferentemente, la biblioteca es una biblioteca que exhibe en fagos scFv, generada usando cDNAs de V_L y V_H humanos preparados a partir de mRNA aislado de células B. Las metodologías para preparar y rastrear tales bibliotecas son conocidos por el arte. Equipos para generar bibliotecas que exhiben en fagos están comercialmente disponibles (por ejemplo, el sistema de anticuerpos recombinantes en fagos Pharmacia (Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), número de catálogo 27-9400-01; y el equipo de exhibición en fagos Stratagene SurfZAP[™], número de catálogo 240612). También existen otros métodos y reactivos que pueden usarse para generar y rastrear bibliotecas que exhiben anticuerpos (vea, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.223.409; Publicación PCT Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs *et al.*, *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991); Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad *et al.*, *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 19:4133-4137 (1991); y Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991).

[0205] En una realización, para aislar un anticuerpo anti-M-CSF humano con las características deseadas, primero se usa un anticuerpo anti-M-CSF humano como descrito en ésta para seleccionar secuencias de cadenas pesadas y livianas humanas que tengan una actividad de ligadura similar hacia M-CSF, usando métodos de imprinting de epítopos descritos en la publicación PCT No. WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método son preferentemente bibliotecas en scFv preparadas y rastreadas según lo descrito en la publicación PCT No. WO 92/01047, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Las bibliotecas de anticuerpos en scFv son rastreadas preferentemente usando como antígeno M-CSF humano.

[0206] Una vez seleccionados dominios V_L y V_H iniciales humanos, se realizan

experimentos de "mix and match" ("mezclar y unir"), en los cuales se rastrean diferentes pares de los segmentos V_L y V_H inicialmente seleccionados para la ligadura con M-CSF, para seleccionar combinaciones preferidas de pares V_L/V_H . Adicionalmente, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H del (de los) par(es) preferido(s) V_L/V_H pueden ser sometidos a mutación aleatoria, preferentemente dentro de la región CDR3 del V_H y/o V_L , en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable por la maduración de la afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de la afinidad *in vitro* puede lograrse mediante la amplificación de dominios V_H y V_L , usando cebadores PCR complementarios a la CDR3 del V_H o CDR3 del V_L , respectivamente, cebadores que han sido "spiked" con (a los cuales se ha agregado) una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones, de modo que los productos PCR resultantes codifiquen segmentos V_H y V_L en los cuales han sido introducidas mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 del V_H y/o CDR3 del V_L . Estos segmentos V_H y V_L sometidos a mutación aleatoria pueden rastrearse nuevamente para la ligadura con M-CSF.

[0207] Después de la selección y aislación de un anticuerpo anti-M-CSF de la invención a partir de una biblioteca que exhibe inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado pueden recuperarse del paquete de exhibición (display package) (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas de DNA recombinante estándar. Si deseado, el ácido nucleico puede ser sometido a manipulación adicional para crear otras formas del anticuerpo de la invención, según lo descrito más abajo. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante el rastreo de una biblioteca combinatoria, el DNA que codifica el anticuerpo es clonado en un vector de expresión recombinante e introducido en células hospedantes mamíferas según lo descrito precedentemente.

Conmutación de clases

[0208] Otro aspecto de la invención provee un método para convertir la clase o subclase de un anticuerpo anti-M-CSF en otra clase o subclase. En algunas realizaciones, se aísla una molécula de ácido nucleico que codifica un V_L o V_H que no incluye secuencias de ácido nucleico cualesquiera que codifiquen C_L o C_H usando métodos bien conocidos por el arte. Luego, la molécula de ácido nucleico se liga operativamente con una secuencia de ácido nucleico que codifica un C_L o C_H de una clase o subclase deseada de inmunoglobulina. Esto puede lograrse usando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , según lo descrito precedentemente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-M-CSF que originalmente fue una IgM puede ser cambiado de clase a una IgG. Además, la conmutación de clase puede usarse para convertir una subclase IgG a otra subclase, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Otro método para producir un anticuerpo de la invención que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-M-CSF y un ácido nucleico que codifica una cadena liviana de un anticuerpo anti-M-CSF, aislar la secuencia que codifica la región V_H , ligar la secuencia V_H con una secuencia que codifica un dominio constante de la cadena pesada del isotipo deseado, expresar el gen de la cadena liviana y la construcción de la cadena pesada en una célula, y recolectar el anticuerpo anti-M-CSF con el isotipo deseado.

[0209] En algunas realizaciones, anticuerpos anti-M-CSF de la invención tienen cambiada la serina en la posición 228 (de acuerdo con la convención de numeración de la EU) de la cadena pesada a prolina. Consecuentemente, la sub-secuencia CPSC en la región F_C de IgG4 llega a ser CPPC, que es la subsecuencia en IgG1. (Aalberse, R.C. y Schuurman, J., *Immunology*, 105:9-19 (2002)). Por ejemplo, la serina en el residuo 243 de SEQ ID NO: 46 (que corresponde al residuo 228 en la convención de numeración de la EU) llegaría a ser prolina. Similarmente, la serina en el residuo 242 de SEQ ID NO: 38 (que corresponde al residuo 228 en la convención de numeración de la EU) llegaría a ser prolina. En algunas realizaciones, la región framework del anticuerpo IgG4 puede ser retro-mutada (back-mutated) a la secuencia framework de la línea germinal. Algunas realizaciones comprenden ambas, la región de framework retro-mutada y el cambio serina a prolina en la región F_C . Veá, por ejemplo, SEQ ID NO: 54 (anticuerpo 9.14.4C-Ser) y SEQ ID NO: 58 (anticuerpo 8.10.3C-Ser) en la Tabla 1.

Anticuerpos desinmunizados

[0210] Otro modo de producir anticuerpos con inmunogenicidad reducida es la

desinmunización de anticuerpos. En otro aspecto de la invención, el anticuerpo puede desinmunizarse usando las técnicas descritas en, por ejemplo, las Publicaciones PCT Nos. WO98/52976 y WO00/34317 (incorporadas en ésta por referencia en su totalidad).

Anticuerpos mutados

[0211] En otra realización, las moléculas de ácido nucleico, los vectores y las células hospedantes pueden usarse para fabricar anticuerpos anti-M-CSF mutados. Los anticuerpos pueden ser mutados en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o livianas, por ejemplo, para modificar una propiedad de ligadura del anticuerpo. Por ejemplo, puede efectuarse una mutación en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo para M-CSF, para aumentar o disminuir k_{off} o para modificar la especificidad de ligadura del anticuerpo. Técnicas de mutagénesis dirigidas a un sitio son bien conocidas por el arte. Vea, por ejemplo, Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*, *supra*. En una realización preferida, se efectúan mutaciones en un residuo de aminoácidos del cual se sabe que está modificado, en comparación con la línea germinal, en un dominio variable de un anticuerpo anti-M-CSF. En otra realización, se efectúan una o más mutaciones en un residuo de aminoácidos del cual se sabe que está cambiado, con respecto a la línea germinal, en una región CDR o región framework de un dominio variable, o en un dominio constante de un anticuerpo monoclonal 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1. En otra realización, se efectúan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido del cual se sabe que está modificado con respecto a la línea germinal en una región CDR o región framework de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada entre SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98 ó 102 ó cuya secuencia nucleotídica de cadena pesada está presente en SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 25, 29, 33, 37, 45, 97 ó 101. En otra realización, se efectúan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido del cual se sabe que está modificado con respecto a la línea germinal en una región CDR o región framework de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos de cadena liviana seleccionada entre SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 44, 48, 52, 56 ó 60 ó cuya secuencia nucleotídica de cadena liviana está presente en SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 27, 31, 35, 43 ó 47.

[0212] En una realización, se efectúa una mutación en la región framework, de modo que la región (las regiones) framework resultante(s) tiene(n) la secuencia de aminoácidos del gen correspondiente de la línea germinal. Puede efectuarse una mutación en una región framework o un dominio constante para aumentar la vida media del anticuerpo anti-M-CSF. Vea, por ejemplo, Publicación PCT No. WO 00/09560, incorporada en ésta por referencia. También puede efectuarse una mutación en una región framework o en un dominio constante para modificar la inmunogenecidad del anticuerpo, para proveer un sitio para la ligadura covalente o no covalente con otra molécula, o para modificar propiedades tales como fijación de complemento, ligadura con FcR y citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)). De acuerdo con la invención, un anticuerpo simple puede tener mutaciones en cualquier o en varias regiones CDRs o framework del dominio variable o en el dominio constante.

[0213] En algunas realizaciones, hay de 1 a 8, incluyendo cualquier número intermedio, mutaciones de aminoácidos en cualquiera de los dominios V_H o V_L del anticuerpo anti-M-CSF mutado en comparación con el anticuerpo anti-M-CSF previo a la mutación. En cualquier caso de los arriba mencionados, las mutaciones pueden ocurrir en una o más regiones CDR. Además, cualquiera de las mutaciones puede consistir de substituciones con aminoácidos conservativos. En algunas realizaciones, no hay más de 5, 4, 3, 2 ó 1 cambios de aminoácido en los dominios constantes.

Anticuerpos modificados

[0214] En otra realización, puede fabricarse un anticuerpo de fusión o una inmunoadhesina que comprende el total o una porción de un anticuerpo anti-M-CSF de la invención ligado con otro polipéptido. En una realización preferida, solo los dominios variables del anticuerpo anti-M-CSF están ligados con el polipéptido. En otra realización preferida, el dominio V_H de un anticuerpo anti-M-CSF está ligado con un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo anti-M-CSF está ligado con un

segundo polipéptido, asociado con el primer polipéptido de modo tal que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí para formar un sitio de ligadura de anticuerpo. En otra realización preferida, el dominio V_H está separado del dominio V_L mediante un engarce, de modo que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí (vea abajo bajo anticuerpos de una sola cadena). Luego, el anticuerpo V_H -engarce- V_L es ligado con el polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido hacia una célula o tejido que expresa M-CSF. El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, un factor de crecimiento u otra proteína regulatoria, o puede ser un agente diagnóstico, tal como una enzima que puede ser fácilmente visualizada, tal como peroxidasa de rábano picante. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos de una sola cadena están ligados entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente sobre una sola cadena polipéptida, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

[0215] Para crear un anticuerpo de cadena simple (scFv), los fragmentos del DNA que codifican V_H y V_L son ligados operativamente con otro fragmento que codifica un engarce flexible, por ejemplo, codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de modo que las secuencias V_H y V_L pueden ser expresadas como una proteína de cadena simple contigua con los dominios V_L y V_H unidos por el engarce flexible. Vea, por ejemplo, Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si se usa solamente una sola V_H y V_L , bivalente, si se usan dos V_H y V_L , o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L . Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se ligan específicamente a M-CSF y a otra molécula.

[0216] En otras realizaciones, pueden prepararse otros anticuerpos modificados usando moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-M-CSF. Por ejemplo, pueden prepararse "cuerpos Kappa" (Ill *et al.*, *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Minicuerpos" (Martin *et al.*, *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diacuerpos" (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Trautnecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Trautnecker *et al.*, *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)) usando técnicas estándar de biología molecular siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

[0217] Anticuerpos biespecíficos o fragmentos que ligan antígeno pueden producirse mediante una variedad de métodos, incluyendo fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Vea, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Además, anticuerpos biespecíficos pueden formarse como "diacuerpos" o "Janusinas". En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se liga a dos epítopes diferentes de M-CSF. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena pesada y una primera cadena liviana del anticuerpo monoclonal 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3 ó 9.7.2 y una cadena pesada y cadena liviana de un anticuerpo adicional. En algunas realizaciones, las cadenas liviana y pesada adicionales también pueden pertenecer a uno de los anticuerpos monoclonales arriba identificados, pero son diferentes de las cadenas pesada y liviana primeras.

[0218] En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados arriba descritos se prepararan usando uno o más de los dominios variables o las regiones CDR de un anticuerpo monoclonal anti-M-CSF humano provisto en ésta, a partir de una secuencia de aminoácidos de dicho anticuerpo monoclonal, o a partir de una cadena pesada o cadena liviana codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo monoclonal.

Anticuerpos derivatizados y marcados

[0219] Un anticuerpo anti-M-CSF o una porción que liga antígeno de la invención puede ser derivatizado o ligado a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). Generalmente, los anticuerpos o una porción de los mismos son derivatizados de modo que la ligadura con M-CSF no sea afectada adversamente por la derivatización o el marcado. Por lo tanto, los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención tienen la intención de incluir ambas, las formas intactas y las formas modificadas de los anticuerpos anti-M-CSF humanos descritos en ésta. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede estar ligado funcionalmente (mediante enlace químico, función genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un

diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción del anticuerpo con otra molécula, tal como una región del núcleo de streptavidina o un rótulo de polihistidina.

[0220] Un tipo de anticuerpo derivatizado es producido mediante la reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos claramente separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimídico), o homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales reticulantes están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

[0221] Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Anticuerpos de detección útiles con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o una porción que liga antígeno de la invención incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina, sustancias fosforescentes a base de lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede estar marcado con enzimas útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo está marcado con una enzima detectable, es detectado mediante el agregado de reactivos adicionales usados por la enzima para producir un producto de reacción que puede ser discernido. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, el agregado de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina lleva a un producto de reacción coloreado detectable. Un anticuerpo también puede ser marcado con biotina y ser detectado mediante medición indirecta de la ligadura de avidina o streptavidina. Un anticuerpo también puede ser marcado con un epítopo polipeptídico predeterminado reconocido por un reporter secundario (por ejemplo, secuencias apareadas de cierres de leucina, sitios de ligadura para anticuerpos secundarios, dominios que ligan metales, rótulos de epítopes). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos mediante brazos espaciadores de longitud variable para reducir el potencial de impedimento estérico.

[0222] Un anticuerpo anti-M-CSF también puede estar marcado con un aminoácido radiomarcado. El anticuerpo anti-M-CSF radiomarcado puede usarse tanto con propósitos diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-M-CSF radiomarcado puede usarse para detectar tumores que expresan M-CSF mediante rayos x u otras técnicas de diagnóstico. Además, el anticuerpo anti-M-CSF radiomarcado puede usarse terapéuticamente como una toxina para células cancerosas o tumores. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los radioisótopos o radionuclidos siguientes: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I y ^{131}I .

[0223] Un anticuerpo anti-M-CSF también puede ser derivatizado con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo dehidrato de carbono. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la vida media en suero o para aumentar la ligadura al tejido.

Composiciones y equipos farmacéuticos

[0224] La invención también se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo antagonista anti-M-CSF humano para el tratamiento de sujetos que necesitan un tratamiento para artritis reumatoide, osteoporosis o aterosclerosis. En algunas realizaciones, el sujeto de tratamiento es un humano. En otras realizaciones, el sujeto es un sujeto veterinario. Los trastornos hiperproliferativos en los cuales monocitos juegan un rol que pueden tratarse mediante un anticuerpo antagonista anti-M-CSF de la invención pueden implicar cualquier tejido u órgano e incluyen, pero no están limitados a, cáncer de cerebro, de pulmón, de células escamosas, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza, de cuello, de hígado, renal, de ovario, de próstata, colorectal, esofágico, ginecológico, nasofaríngeo o de tiroide, melanomas, linfomas, leucemias o mielomas múltiples. En particular, los anticuerpos anti-M-CSF antagonistas humanos de la invención son útiles para tratar o prevenir carcinomas de mama, próstata, colon y pulmón.

[0225] Esta invención también comprende composiciones para el tratamiento en un mamífero, incluyendo un humano, de una condición seleccionada del grupo formado por artritis, artritis psoriática, síndrome de Reiter, gota, artritis traumática, artritis rubella y sinovitis aguda, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, espondilitis anquilosante,

osteoartritis, artritis gotosa y otras condiciones de artritis, sepsis, shock séptico, shock endotóxico, sepsis gram negativa, síndrome de shock tóxico, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, neurotrauma, asma, síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto, malaria cerebral, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, enfermedad de resorción ósea, osteoporosis, re-estenosis, daño de reperfusión cardíaca y renal, trombosis, glomerulonefritis, diabetes, reacción del injerto contra el hospedante, rechazo del aloinjerto, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, esclerosis múltiple, degeneración muscular, eczema, dermatitis de contacto, psoriasis, quemadura de sol o shock de conjuntivitis, composiciones que comprenden una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-M-CSF humano de la invención efectivo en tal tratamiento y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0226] El tratamiento puede implicar la administración de uno o más anticuerpos monoclonales anti-M-CSF antagonistas de la invención, o fragmentos que ligan antígeno de los mismos, solos o con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Según lo usado en ésta, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución fisiológica, solución fisiológica buferada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, como así también combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes de humectación o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsión, preservativos o búfferes, que aumentan la vida de estante o efectividad del anticuerpo.

[0227] Los anticuerpos anti-M-CSF de la invención y las composiciones que los comprenden pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos, diagnósticos o profilácticos adicionales. Agentes terapéuticos adicionales incluyen otros agentes anti-neoplásicos, anti-tumorales, anti-angiogénicos o quimioterapéuticos. Tales agentes adicionales pueden estar incluidos en la misma composición o ser administrados por separado. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más anticuerpos anti-M-CSF inhibitorios de la invención como vacuna o como adjuvantes de una vacuna.

[0228] Las composiciones de esta invención pueden estar en varias formas, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y de infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración deseado y de la aplicación terapéutica. Composiciones preferidas típicas están en la forma de soluciones inyectables o de infusión, tales como las composiciones similares a aquellas usadas para la inmunización pasiva de humanos. El modo de administración preferido es el parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea. En otra realización, la invención incluye un método para tratar un sujeto que lo necesita con un anticuerpo o una porción que liga antígeno del mismo que se liga específicamente a M-CSF, método que comprende las etapas de: (a) administrar una cantidad efectiva de una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada o la porción que liga antígeno del mismo, una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la cadena liviana o la porción que liga antígeno del mismo, o ambos, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena liviana y la cadena pesada o las porciones que ligan antígeno de los mismos; y (b) expresar la molécula de ácido nucleico.

[0229] Composiciones terapéuticas típicas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de droga. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un anticuerpo anti-M-CSF en la cantidad requerida de un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes arriba enumerados, según lo requerido, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un

vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre aquellos arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización que provee un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de tales ingredientes. Puede mantenerse la fluidez apropiada de una solución, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante la manutención del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de agentes tensoactivos. Puede lograrse una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0230] Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos por el arte, si bien la ruta/modo preferido de administración para muchas aplicaciones terapéuticas es la infusión subcutánea, intramuscular o intravenosa. Como será apreciado por el entendido en el arte, la ruta y/o modo de administración variará en dependencia de los resultados deseados.

[0231] En ciertas realizaciones, el compuesto activo de las composiciones de anticuerpo puede ser preparado con un excipiente que protegerá el anticuerpo contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como vinilacetato de etileno, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o generalmente conocidos por los entendidos en el arte. Vea, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

[0232] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-M-CSF de la invención puede ser administrado oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un excipiente comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si deseado) también puede ser encerrado en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimido en tabletas o incorporado directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los anticuerpos anti-M-CSF pueden ser incorporados con excipientes y ser usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante otro tipo de administración que la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

[0233] También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos adicionales. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-M-CSF de la invención es co-formulado y/o co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes incluyen anticuerpos que ligan otros blancos, agentes antineoplásicos, agentes antitumorales, agentes quimioterapéuticos, análogos peptídicos que inhiben M-CSF, *c-fms* soluble que puede ligar M-CSF, uno o más agentes químicos que inhiben M-CSF, agentes anti-inflamatorios, anti-coagulantes, agentes que disminuyen la presión sanguínea (por ejemplo, inhibidores de la enzima que convierte angiotensina (ACE)). Tales terapias de combinación pueden requerir dosificaciones menores del anticuerpo anti-M-CSF como así también de los agentes co-administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con varias monoterapias.

[0234] Los anticuerpos anti-M-CSF inhibitorios de la invención y las composiciones que los comprenden también pueden administrarse en combinación con otros regímenes terapéuticos, particularmente en combinación con un tratamiento de radiación para cáncer. Los compuestos de la presente invención también pueden usarse en combinación con agentes anticáncer tales como endostatina y angiostatina o drogas citotóxicas tales como adriamicina, daunomicina, cis-platino, etoposida, taxol, taxotere y alcaloides, tales como vincristina, inhibidores de farnesil transferasa, inhibidores de VEGF y antimetabolitos tal como metotrexato.

[0235] Los compuestos de la invención también pueden usarse en combinación con agentes antivirales tales como Viracept, AZT, aciclovir y famciclovir y compuestos antisépticos tal como Valant.

[0236] Las composiciones de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o

una porción que liga antígeno de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una cantidad con la cual se compensan efectos tóxicos o perniciosos cualesquiera del anticuerpo o porción de anticuerpo mediante los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos previo a, o en una etapa anterior de, la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

[0237] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, varias dosis divididas durante un periodo de tiempo, o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en la forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. "Forma de unidad de dosificación", según lo usado en ésta, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el tratamiento de sujetos mamíferos; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosificación de la invención es dictada por, y directamente dependiente de, (a) las características únicas del anticuerpo anti-M-CSF o la porción del mismo y del efecto terapéutico o profiláctico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes al arte de formular la composición de tal anticuerpo para el tratamiento de la enfermedad en individuos.

[0238] Una gama típica, no limitante, para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,025 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1-25, 0,1 a 10 ó 0,1 a 3 mg/kg. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a ser aliviada. Debe entenderse, además, que para cualquier sujeto particular deben ajustarse regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo, de acuerdo con la necesidad del individuo y la evaluación profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que las gamas de dosificación establecidas en ésta son dadas solamente a modo de ejemplo y no tienen la intención de limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

[0239] Otro aspecto de la presente invención provee equipos que comprenden un anticuerpo anti-M-CSF o una porción que liga antígeno de la invención o una composición que comprende tal anticuerpo o porción. Un equipo puede incluir, además del anticuerpo o la composición, agentes diagnósticos o terapéuticos. Un equipo también puede incluir instrucciones para el uso en un método diagnóstico o terapéutico. En una realización preferida, el equipo incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y un agente diagnóstico que puede ser usado en un método descrito más abajo. En otra realización preferida, el equipo incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden usarse en un método descrito más abajo. Una realización de la invención es un equipo que comprende un contenedor, instrucciones sobre la administración de un anticuerpo anti-M-CSF a un humano que sufre de una enfermedad inflamatoria, o instrucciones para medir el número de monocitos CD14+CD16+ en una muestra biológica y un anticuerpo anti-M-CSF.

[0240] Esta invención también se refiere a composiciones para inhibir el crecimiento celular anormal en un mamífero, composición que comprende una cantidad de un anticuerpo de la invención en combinación con una cantidad de un agente quimioterapéutico, donde las cantidades de compuesto, sal, solvato o prodroga y del agente quimioterapéutico son conjuntamente efectivas para inhibir un crecimiento celular anormal. Actualmente el arte conoce muchos agentes quimioterapéuticos. En algunas

realizaciones, el agente quimioterapéutico es seleccionado del grupo formado por inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos de intercalado, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas, por ejemplo, anti-andrógenos y agentes anti-angiogénesis.

[0241] Agentes de anti-angiogénesis, tales como inhibidores de MMP-2 (matriz-metaloproteínasa 2), inhibidores de MMP-9 (matriz-metaloproteínasa 9) e inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II) pueden usarse conjuntamente con un anticuerpo anti-M-CSF de la invención. Ejemplos de inhibidores COX-II útiles incluyen CELEBREX™ (celecoxib), valdecoxib y rofecoxib. Ejemplos de inhibidores de matriz-metaloproteínasa útiles se describen en WO 96/33172 (publicada el 24 de octubre de 1996), WO 96/27583 (publicada el 7 de marzo de 1996), Solicitud de Patente Europea No. 97304971.1 (solicitada el 8 de julio de 1997), Solicitud de Patente Europea No. 99308617.2 (solicitada el 29 de octubre de 1999), WO 98/07697 (publicada el 26 de febrero de 1998), WO 98/03516 (publicada el 29 de enero de 1998), WO 98/34918 (publicada el 13 de agosto de 1998), WO 98/34915 (publicada el 13 de agosto de 1998), WO 98/33768 (publicada el 6 de agosto de 1998), WO 98/30566 (publicada el 16 de julio de 1998), Publicación de Patente Europea 606,046 (publicada el 13 de julio de 1994), Publicación de Patente Europea 931.788 (publicada el 28 de julio de 1999), WO 90/05719 (publicada el 31 de mayo de 1990), WO 99/52910 (publicada el 21 de octubre de 1999), WO 99/52889 (publicada el 21 de octubre de 1999), WO 99/29667 (publicada el 17 de junio de 1999), Solicitud Internacional PCT No. PCT/IB98/01113 (solicitada el 21 de julio de 1998), Solicitud de Patente Europea No. 99302232.1 (solicitada el 25 de marzo de 1999), solicitud de patente de Gran Bretaña número 9912961.1 (solicitada el 3 de junio de 1999), Solicitud Provisional U.S. No. 60/148,464 (solicitada el 12 de agosto de 1999), Patente U.S. 5.863.949 (concedida el 26 de enero de 1999), Patente U.S. 5.861.510 (concedida el 19 de enero de 1999), y Publicación de Patente Europea 780.386 (publicada el 25 de junio de 1997), todas las cuales están incorporadas en ésta en su totalidad por referencia. Inhibidores de MMP preferidos son aquellos que no muestran artralgia. Más preferidos son aquellos que inhiben selectivamente MMP-2 y/o MMP-9 con relación a las otras matriz-metaloproteínasas (es decir, MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13). Algunos ejemplos específicos de inhibidores de MMP útiles en la presente invención son AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830, y los compuestos enumerados en la lista siguiente: ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenesulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclopentil)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octan-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(2-cloro-4-fluoro-benciloxi)-bencensulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahydro-piran-4-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclobutil)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahydro-piran-4-carboxílico; hidroxiamida del ácido (R) 3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahydro-piran-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(4-fluoro-2-metil-benciloxi)-bencensulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-1-metil-etil)-amino]-propiónico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonil]-(4-hidroxicarbamoil-tetrahydro-piran-4-il)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octan-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido 3-endo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octan-3-carboxílico; y hidroxiamida del ácido (R) 3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahydro-furan-3-carboxílico; y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

[0242] Un compuesto que comprende un anticuerpo monoclonal anti-M-CSF humano de la invención también puede usarse con inhibidores de transducción de señales, tales como agentes que pueden inhibir respuestas al EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico), tales como anticuerpos de EGF-R, anticuerpos EGF y moléculas que son inhibidores de EGF-R; inhibidores del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) tales como receptores VEGF-R y moléculas que pueden inhibir VEGF; e inhibidores del receptor erbB2, tales como moléculas orgánicas o anticuerpos que se ligan al receptor erbB2, por ejemplo, HERCEPTIN™ (Genentech, Inc.). Los inhibidores del EGF-R se

describen, por ejemplo, en WO 95/19970 (publicada el 27 de julio de 1995), WO 98/14451 (publicada el 9 de abril de 1998), WO 98/02434 (publicada el 22 de enero de 1998), y la Patente de los Estados Unidos 5.747.498 (concedida el 5 de mayo de 1998), y tales sustancias pueden usarse en la presente invención según lo descrito en ésta. Los agentes inhibidores del EGFR incluyen, pero no están limitados a, los anticuerpos monoclonales C225 y anti-EGF-R 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. y Merck KgaA), y los compuestos ZD-1834, ZD-1838 y ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomida (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183,805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387,785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusión EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) y Vacuna EGF-R (York Medical/Centro de Immunología Molecular (CIM)). Estos y otros agentes inhibidores de EGF-R pueden usarse en la presente invención.

[0243] Los inhibidores de VEGF, por ejemplo SU-5416 y SU-6668 (Sugen Inc.), AVASTIN™ (Genentech), SH-268 (Schering) y NX-1838 (NeXstar) también pueden combinarse con el compuesto de la presente invención. Los inhibidores de VEGF se describen en, por ejemplo, WO 99/24440 (publicada el 20 de mayo de 1999), Solicitud Internacional PCT PCT/IB99/00797 (solicitada el 3 de mayo de 1999), WO 95/21613 (publicada el 17 de agosto de 1995), WO 99/61422 (publicada el 2 de diciembre de 1999), Patente de los Estados Unidos 5.834.504 (concedida el 10 de noviembre de 1998), WO 98/50356 (publicada el 12 de noviembre de 1998), Patente de los Estados Unidos 5.883.113 (concedida el 16 de marzo de 1999), Patente de los Estados Unidos 5.886.020 (concedida el 23 de marzo de 1999), Patente de los Estados Unidos 5.792.783 (concedida el 11 de agosto de 1998), WO 99/10349 (publicada el 4 de marzo de 1999), WO 97/32856 (publicada el 12 de setiembre de 1997), WO 97/22596 (publicada el 26 de junio de 1997), WO 98/54093 (publicada el 3 de diciembre de 1998), WO 98/02438 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 99/16755 (publicada el 8 de abril de 1999), y WO 98/02437 (publicada el 22 de enero de 1998), todas las cuales están incorporadas en ésta en su totalidad por referencia. Otros ejemplos de algunos inhibidores específicos de VEGF útiles en la presente invención son IM862 (Cytran Inc.); anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc.; y angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme y Chiron. Estos y otros inhibidores de VEGF pueden usarse en la presente invención según lo descrito en ésta. Los inhibidores del receptor erbB2, tales como GW-282974 (Glaxo Wellcome plc), y los anticuerpos monoclonales AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) y 2B-1 (Chiron) pueden ser combinados además con los compuestos de la invención, por ejemplo aquellos indicados en WO 98/02434 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 99/35146 (publicada el 15 de julio de 1999), WO 99/35132 (publicada el 15 de julio de 1999), WO 98/02437 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 97/13760 (publicada el 17 de abril de 1997), WO 95/19970 (publicada el 27 de julio de 1995), Patente de los Estados Unidos 5.587.458 (concedida el 24 de diciembre de 1996), y Patente de los Estados Unidos 5.877.305 (concedida el 2 de marzo de 1999), todas las cuales están incorporadas en ésta en su totalidad por referencia. Los inhibidores del receptor erbB2 útiles en la presente invención también se describen en la Patente de los Estados Unidos 6.465.449 (concedida el 15 de octubre de 2002), y en la Patente de los Estados Unidos 6.284.764 (concedida el 4 de setiembre de 2001), ambas incorporadas en ésta en su totalidad por referencia. Los compuestos inhibidores del receptor erbB2 y la sustancia descrita en las solicitudes PCT, patentes U.S. y solicitudes provisionales U.S. arriba mencionadas, como así también otros compuestos y sustancias que inhiben el receptor erbB2, pueden usarse con el compuesto de la presente invención de acuerdo con la presente invención.

[0244] Los agentes anti-supervivencia incluyen anticuerpos anti-IGF-IR y agentes anti-integrina, tales como anticuerpos anti-integrina.

[0245] Los agentes anti-inflamatorios pueden usarse conjuntamente con un anticuerpo anti-M-CSF de la invención. Para el tratamiento de la artritis reumatoide, los anticuerpos

anti-M-CSF humanos de la invención pueden combinarse con agentes tales como inhibidores de TNF- α tales como drogas TNF (tales como REMICADE™, CDP-870 y HUMIRA™) y moléculas de inmunoglobulina del receptor de TNF (tal como ENBREL™), inhibidores de IL-1, antagonistas del receptor o IL-1ra. soluble (por ejemplo Kineret o inhibidores de ICE), inhibidores de COX-2 (tales como celecoxib, rofecoxib, valdecoxib y etoricoxib), inhibidores de metaloproteasa (preferentemente inhibidores selectivos para MMP-13), inhibidores de p2X7, ligandos de $\alpha 2\beta$ (tales como NEUROTIN™ y PREGABALIN™), metotrexato de dosis baja, leflunomida, hidroxicloroquina, d-penicilamina, auranofina u oro parenteral u oral. Los compuestos de la invención también pueden usarse en combinación con agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de osteoartritis. Agentes adecuados a ser usados en combinación incluyen agentes no esteroides anti-inflamatorios (en lo sucesivo NSAID's) tales como piroxicam, diclofenac, ácidos propiónicos tales como naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, quetoprofeno e ibuprofeno, fenamatos tales como ácido mefenámico, indometacina, sulindac, apasona, pirazonas tal como fenilbutazona, salicilatos tal como aspirina, inhibidores de COX-2 tales como celecoxib, valdecoxib, rofecoxib y etoricoxib, analgésicos y terapias intraarticulares tales como corticosteroides y ácidos hialurónicos tales como hialgan y sinvisc.

[0246] Los agentes anti-coagulantes pueden usarse conjuntamente con un anticuerpo anti-M-CSF de la invención. Ejemplos de agentes anti-coagulantes incluyen, pero no están limitados a, varfarina (COUMADIN™), heparina y enoxaparina (LOVENOX™).

[0247] Los anticuerpos anti-M-CSF humanos de la presente invención también pueden usarse en combinación con agentes cardiovasculares tales como bloqueadores de canales de calcio, agentes que disminuyen el nivel de lípidos tales como estatinas, fibratos, bloqueadores beta, inhibidores de ACE, antagonistas del receptor de angiotensina-2 e inhibidores de la agregación plaquetaria. Los compuestos de la presente invención también pueden usarse en combinación con agentes del sistema nervioso central (CNS) tales como antidepresivos (tal como sertralina), drogas antiparkinsonianas, tales como deprenil, L-dopa, EQUIP™, MIRAPEX™, inhibidores de MAOB tales como selegina y rasagilina, inhibidores de comP tal como Tasmar, inhibidores de A-2, inhibidores de la reabsorción de dopamina, antagonista de NMDA, agonistas de nicotina, agonistas de dopamina e inhibidores de la sintasa neuronal de óxido nítrico), y drogas anti-Alzheimer tales como donepezil, tacrina, inhibidores de LIGANDOS $\alpha 2\beta$ (tales como NEUROTIN™ y PREGABALIN™), inhibidores de COX-2, propentofilina o metrifonato.

[0248] Los anticuerpos anti-M-CSF humanos de la presente invención también pueden usarse en combinación con agentes de osteoporosis tales como roloxifeno, droloxifeno, lasofoxifeno o fosomax y agentes inmunosupresores tales como FK-506 y rapamicina.

Métodos diagnósticos usados

[0249] En otro aspecto, la invención provee métodos diagnósticos. Los anticuerpos anti-M-CSF pueden usarse para detectar M-CSF en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En una realización, la invención provee un método para diagnosticar la presencia o ubicación de un tumor que expresa M-CSF en un sujeto que necesita tal diagnóstico, método que comprende las etapas de inyectar el anticuerpo en el sujeto, determinar la expresión de M-CSF en el sujeto mediante la localización del sitio de ligadura del anticuerpo, comparar la expresión en el sujeto con aquella de un sujeto de referencia normal o estándar y diagnosticar la presencia o ubicación del tumor.

[0250] Los anticuerpos anti-M-CSF pueden usarse en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ensayo ELISA, un ensayo RIA, FACS, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia de Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-M-CSF de la invención pueden usarse para detectar M-CSF de humanos. En otra realización, los anticuerpos anti-M-CSF pueden usarse para detectar M-CSF de primates tales como monos cynomologus, monos rhesus, chimpancés o simios. La invención provee un método para detectar M-CSF en una muestra biológica, método que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-M-CSF de la invención y detectar el anticuerpo ligado. En una realización, el anticuerpo anti-M-CSF está marcado directamente con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo anti-M-CSF (el primer anticuerpo) no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede ligar al anticuerpo anti-M-CSF está marcado. Como es bien conocido por un entendido en el arte, se elige un segundo anticuerpo que sea capaz de ligar

específicamente la especie y clase particular del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-M-CSF es una IgG humana, entonces el segundo anticuerpo puede ser una IgG anti-humana. Otras moléculas que pueden ligarse con anticuerpos incluyen, sin limitación, Proteína A y Proteína G, ambas disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pierce Chemical Co.

[0251] Marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se han revelado supra, e incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen streptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

[0252] En otras realizaciones, M-CSF puede ensayarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición utilizando estándares de M-CSF marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-M-CSF no marcado. En este ensayo se combinan la muestra biológica, los estándares de M-CSF marcados y el anticuerpo anti-M-CSF, y se determina la cantidad de M-CSF estándar marcado ligada al anticuerpo no marcado. La cantidad de M-CSF en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de M-CSF estándar marcado ligada al anticuerpo anti-M-CSF.

[0253] Los inmunoensayos arriba expuestos pueden usarse para varios propósitos. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-M-CSF para detectar M-CSF en células o sobre la superficie celular de las células en un cultivo celular, o segregado en el medio de cultivo de tejidos. Los anticuerpos anti-M-CSF pueden usarse para determinar la cantidad de M-CSF sobre la superficie de células o segregado en el medio de cultivo de tejidos que han sido tratados con varios compuestos. Este método puede usarse para identificar compuestos que son útiles para inhibir o activar la expresión o secreción de M-CSF. De acuerdo con este método, una muestra de células se trata con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo, mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si desea medirse el nivel total de M-CSF, las células se someten a lisis y se mide el nivel total de M-CSF usando uno de los inmunoensayos descritos precedentemente. El nivel total de M-CSF en las células tratadas se compara con el nivel de M-CSF en las células no tratadas para determinar el efecto del compuesto de ensayo.

[0254] Un inmunoensayo para medir niveles de M-CSF total es un ensayo ELISA o de transferencia de Western. Si desea medirse el nivel de M-CSF en la superficie celular, las células no se someten a lisis, y se pueden medir los niveles de M-CSF en la superficie celular, usando uno de los inmunoensayos descritos precedentemente. Un inmunoensayo para determinar niveles de M-CSF en la superficie celular puede incluir las etapas de marcar las proteínas de la superficie celular con un marcador detectable, tal como biotina o ^{125}I , inmunoprecipitar el M-CSF con un anticuerpo anti-M-CSF y detectar luego el M-CSF marcado. Otro inmunoensayo para determinar la localización de M-CSF, por ejemplo, niveles en la superficie celular, puede ser inmunohistoquímica. Métodos tales como ELISA, RIA, transferencia de Western, inmunohistoquímica, marcado en la superficie celular de proteínas integrales de la membrana e inmunoprecipitación son bien conocidos por el arte. Vea, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. Además, los inmunoensayos pueden realizarse en mayor escala para una clasificación de alto rendimiento, con el fin de ensayar un gran número de compuestos para la activación o inhibición de M-CSF.

[0255] Otro ejemplo de un inmunoensayo para medir niveles de M-CSF segregado puede ser un ensayo de captación de antígeno, ELISA, ensayo inmunohistoquímico, transferencia de Western y similares usando anticuerpos de la invención. Si se desea medir M-CSF segregado, puede ensayarse un medio de cultivo celular o un fluido corporal, tales como suero sanguíneo, orina o fluido sinovial, por M-CSF segregado y/o pueden lisarse células para liberar M-CSF producido, pero todavía no segregado. Un inmunoensayo para determinar niveles segregados de M-CSF incluye las etapas de marcar las proteínas segregadas con un marcador detectable, tal como biotina o ^{125}I , inmunoprecipitar el M-CSF con un anticuerpo anti-M-CSF y detectar luego el M-CSF

marcado. Otro inmunoensayo para determinar niveles segregados de M-CSF puede incluir las etapas de (a) pre-ligar anticuerpos anti-M-CSF a la superficie de una placa de microtitulación; (b) agregar un medio celular de cultivo de tejido o un fluido corporal que contiene el M-CSF segregado a las cavidades de la placa de microtitulación para ligarlo a los anticuerpos anti-M-CSF; (c) agregar un anticuerpo que detectará el anticuerpo anti-M-CSF, por ejemplo, anti-M-CSF marcado con digoxigenina que se liga a un epítipo de M-CSF diferente al anticuerpo anti-M-CSF de la etapa (a); (d) agregar un anticuerpo a digoxigenina conjugada a peroxidasa; y (e) agregar un sustrato de peroxidasa que proveerá un producto de reacción coloreado que puede ser cuantificado para determinar el nivel de M-CSF segregado en un medio celular de cultivo de tejido o una muestra de un fluido corporal. Métodos tales como ELISA, RIA, transferencia de Western, inmunohistoquímica y ensayo de captación de antígenos son bien conocidos por el arte. Veá, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. Además, los inmunoensayos pueden realizarse en mayor escala para una clasificación de alto rendimiento, con el fin de ensayar un gran número de compuestos para la activación o inhibición de M-CSF.

[0256] Los anticuerpos anti-M-CSF de la invención también pueden usarse para determinar los niveles de M-CSF en la superficie celular en un tejido o en células derivadas del tejido. En algunas realizaciones, el tejido es un tejido enfermo. En algunas realizaciones, el tejido puede ser un tumor o una biopsia del mismo. En algunas realizaciones del método, un tejido o una biopsia del mismo puede ser extirpado de un paciente. Luego, el tejido o biopsia puede usarse en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, niveles totales de M-CSF, niveles de M-CSF en la superficie celular o la localización de M-CSF mediante métodos discutidos precedentemente.

[0257] El método puede comprender las etapas de administrar un anticuerpo anti-M-CSF marcado en forma detectable o una composición que lo comprende a un paciente que necesita tal ensayo diagnóstico y someter al paciente a un análisis por imagen para determinar la ubicación de los tejidos que expresan M-CSF. El análisis por imagen es bien conocido por el arte médico, e incluye, sin limitación, análisis con rayos x, diagnóstico por imagen con resonancia magnética (MRI) o tomografía computada (CE). El anticuerpo puede marcarse con cualquier agente adecuado para diagnóstico por imagen *in vivo*, por ejemplo un agente de contraste, tal como bario, que puede usarse para análisis con rayos x, o un agente de contraste magnético, tal como un quelato de gadolinio, que puede usarse para MRI o CE. Otros agentes para marcación incluyen, sin limitación, radioisótopos, tal como ^{99}Tc . En otra realización, el anticuerpo anti-M-CSF no estará marcado y será diagnosticado por imagen mediante la administración de un segundo anticuerpo u otra molécula que sea detectable y que pueda ligar el anticuerpo anti-M-CSF. En una realización, se obtiene una biopsia del paciente para determinar si el tejido de interés expresa M-CSF.

[0258] Los anticuerpos anti-M-CSF de la invención también pueden usarse para determinar los niveles segregados de M-CSF en un fluido corporal tal como suero sanguíneo, orina o fluido sinovial derivado de un tejido. En algunas realizaciones, el fluido corporal es de un tejido enfermo. En algunas realizaciones, el fluido corporal es de un tumor o una biopsia del mismo. En algunas realizaciones del método, se separa fluido corporal de un paciente. Luego se usa el fluido en un inmunoensayo para determinar niveles de M-CSF segregado mediante los métodos discutidos precedentemente. Una realización de la invención es un método para ensayar la actividad de un antagonista de M-CSF, método que comprende: administrar un antagonista de M-CSF a un primate o sujeto humano y medir el número de monocitos CD14+CD16+ en una muestra biológica.

Métodos terapéuticos usados

[0259] En otra realización, la invención provee un método para inhibir la actividad de M-CSF mediante la administración de un anticuerpo anti-M-CSF a un paciente que lo necesita. Cualquiera de los tipos de anticuerpos descritos en ésta puede usarse terapéuticamente. En una realización preferida, el anticuerpo anti-M-CSF es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. En otra realización preferida, el M-CSF es humano y el paciente es un paciente humano. Alternativamente, el paciente puede ser un mamífero que expresa un M-CSF con el cual el anticuerpo anti-M-CSF reacciona en forma cruzada. El anticuerpo puede ser administrado a un mamífero no humano que expresa un M-CSF con el cual el anticuerpo reacciona en forma cruzada (es decir, de un primate) con propósitos veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Tales

modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de esta invención.

[0260] Según lo usado en ésta, el término "un trastorno en el cual la actividad de M-CSF es perniciosa" incluye enfermedades y otros trastornos en los cuales la presencia de elevados niveles de M-CSF en un sujeto que sufre del trastorno mostró ser, o supuestamente es, responsable por la patofisiología del trastorno o es un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. Tales trastornos pueden ser puestos en evidencia, por ejemplo, por un aumento en los niveles de M-CSF segregado y/o sobre la superficie celular o por la autofosforilación aumentada de la tirosina de *c-fms* en las células o los tejidos afectados de un sujeto que sufre el trastorno. El aumento de niveles de M-CSF puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-M-CSF según lo descrito precedentemente.

[0261] En una realización, un anticuerpo anti-M-CSF puede administrarse a un paciente que tiene un tumor que expresa *c-fms* o un tumor que segrega M-CSF y/o que expresa M-CSF sobre su superficie celular. Preferentemente, el tumor expresa un nivel de *c-fms* o M-CSF que es mayor que el nivel en un tejido normal. El tumor puede ser un tumor sólido o puede ser un tumor no sólido, tal como un linfoma. En una realización más preferida, un anticuerpo anti-M-CSF puede administrarse a un paciente que tiene un tumor que expresa *c-fms*, un tumor que expresa M-CSF o un tumor que segrega M-CSF que es canceroso. Además, el tumor puede ser canceroso. En una realización aún más preferida, el tumor es un cáncer de pulmón, mama, próstata o colon. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-M-CSF administrado a un paciente resulta en que M-CSF no esté más ligado al receptor *c-fms*. En una realización altamente preferida, el método causa que el tumor no aumente en peso o volumen o que disminuya en peso o volumen. En otra realización, el método causa que el *c-fms* sobre células tumorales no esté ligado por M-CSF. En otra realización, el método causa que el M-CSF sobre células tumorales no esté ligado a *c-fms*. En otra realización, el método causa que el M-CSF segregado de las células tumorales no esté ligado a *c-fms*. En una realización preferida, el anticuerpo se selecciona entre 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3, 9.7.2, 9.7.2C-Ser, 9.14.4C-Ser, 8.10.3C-Ser, 8.10.3-CG2, 9.7.2-CG2, 9.7.2-CG4, 9.14.4-CG2, 9.14.4-CG4, 9.14.4-Ser, 9.7.2-Ser, 8.10.3-Ser, 8.10.3-CG4, 8.10.3FG1 ó 9.14.4G1 ó comprende una cadena pesada, cadena liviana o región que liga antígeno del mismo.

[0262] En otra realización preferida, un anticuerpo anti-M-CSF puede administrarse a un paciente que expresa niveles inapropiadamente elevados de M-CSF. El arte conoce que la expresión de niveles elevados de M-CSF puede conducir a una variedad de cánceres comunes. En una realización, dicho método se refiere al tratamiento de cáncer, tal como cáncer de cerebro, de células escamosas, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza, de cuello, esofágico, de próstata, colorectal, de pulmón, renal, de riñón, de ovarios, ginecológico o de tiroides. Pacientes que pueden tratarse con un compuesto de la invención de acuerdo con los métodos de esta invención incluyen, por ejemplo, pacientes a los cuales se ha diagnosticado o que tienen cáncer de pulmón, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y de cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer estomacal, cáncer del colon, cáncer de mamas, tumores ginecológicos (por ejemplo, sarcomas uterinos, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma cervical, carcinoma de la vagina o carcinoma de la vulva), enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino (por ejemplo, cáncer de las glándulas tiroide, paratiroide o adrenales), sarcomas de los tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, tumores sólidos (por ejemplo, sarcomas, carcinomas o linfomas que son cánceres de tejidos corporales diferentes de sangre, médula ósea o el sistema linfático), tumores sólidos de la niñez, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o de la uretra (por ejemplo, carcinoma de las células renales, carcinoma de la pelvis renal), o neoplasmas del sistema nervioso central (por ejemplo, linfoma del sistema nervioso central (CNS) primario, tumores del eje espinal, gliomas de las células madre de cerebro o adenomas pituitarios). En una realización más preferida, el anticuerpo anti-M-CSF se administra a un paciente con cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón o cáncer de colon. En una realización aún más preferida, el

método causa la detención de la proliferación anormal, el aumento del peso o volumen o la disminución del peso o volumen del tumor debido al cáncer.

[0263] El anticuerpo puede administrarse una sola vez, pero más preferentemente se administra varias veces. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse de tres veces por día a una vez cada seis meses o período mayor. La administración puede realizarse según un programa tal como tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. También puede administrarse el anticuerpo en forma continua vía una minibomba. El anticuerpo puede administrarse vía ruta oral, mucosal, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral o tópica. El anticuerpo puede administrarse en el sitio del tumor o la parte inflamada del cuerpo, en el tumor o la parte inflamada del cuerpo o en un sitio distante del sitio del tumor o la parte inflamada del cuerpo. El anticuerpo puede administrarse una vez, al menos dos veces o al menos durante el período de tiempo necesario para tratar, paliar o curar la condición. Generalmente el anticuerpo será administrado mientras que el tumor esté presente, siempre que el anticuerpo tenga el efecto de detener el crecimiento o disminuir el peso o volumen del tumor, o hasta que esté curada la parte inflamada del cuerpo. Generalmente el anticuerpo será administrado como parte de una composición farmacéutica como la descrita *supra*. La dosificación del anticuerpo estará generalmente en la gama de 0,1-100 mg/kg, más preferentemente 0,5-50 mg/kg, más preferentemente 1-20 mg/kg y aún más preferentemente 1-10 mg/kg. La concentración del anticuerpo en suero puede medirse mediante cualquier método conocido en el arte.

[0264] En otro aspecto, el anticuerpo anti-M-CSF puede co-administrarse con otros agentes terapéuticos, tales como agentes anti-inflamatorios, agentes anti-coagulantes, agentes que disminuirán o reducirán la presión sanguínea, drogas o moléculas anti-neoplásicas, a un paciente que tiene un trastorno hiperproliferativo, tal como cáncer o un tumor. En un aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento del trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención en combinación con un agente antitumoral seleccionado del grupo formado por, pero no limitado a, inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, agentes de intercalado, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, inhibidores de quinasa, inhibidores de matriz metaloproteasa, productos terapéuticos genéticos y anti-andrógenos. En una realización más preferida, el anticuerpo puede administrarse con un agente antineoplásico, tal como adriamicina o taxol. En otra realización preferida, el anticuerpo o la combinación terapéutica se administra conjuntamente con radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otra inmunoterapia. En aún otra realización preferida, el anticuerpo será administrado conjuntamente con otro anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-M-CSF puede administrarse conjuntamente con un anticuerpo u otro agente conocido por inhibir tumores o la proliferación de células cancerosas, por ejemplo, un anticuerpo o agente que inhibe el receptor erbB2, EGF-R, CD20 o VEGF.

[0265] La co-administración del anticuerpo con un agente terapéutico adicional (terapia de combinación) incluye administrar una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-M-CSF y el agente terapéutico adicional y administrar dos o más composiciones farmacéuticas por separado, una que comprende el anticuerpo anti-M-CSF y la otra (las otras) que comprende(n) el agente (los agentes) terapéutico(s) adicional(es). Además, si bien co-administración o terapia combinatoria significa generalmente administrar el anticuerpo y los agentes terapéuticos adicionales simultáneamente, también incluye casos en los cuales el anticuerpo y los agentes terapéuticos adicionales son administrados en tiempos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse una vez cada tres días, mientras que el agente terapéutico se administra una vez por día. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse antes o después del tratamiento del trastorno con el agente terapéutico adicional. Similarmente, el anticuerpo anti-M-CSF puede administrarse antes o después de otra terapia, tales como radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otra inmunoterapia.

[0266] El anticuerpo y uno o más agentes terapéuticos adicionales (la terapia combinatoria) pueden administrarse una vez, dos veces o al menos durante el período de

tiempo necesario para tratar, paliar o curar la condición. Preferentemente, la terapia de combinación se administra varias veces. La terapia combinatoria puede administrarse desde tres veces por día a una vez cada seis meses. La administración puede realizarse según un programa tal como tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses, o puede administrarse en forma continua vía una minibomba. La terapia de combinación puede administrarse vía ruta oral, mucosal, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral o tópica. La terapia combinatoria puede administrarse en un sitio distante del sitio del tumor. Generalmente la terapia de combinación será administrada mientras que el tumor esté presente, siempre que el anticuerpo tenga el efecto de detener el crecimiento o disminuir el peso o volumen del tumor.

[0267] En aún otra realización, el anticuerpo anti-M-CSF está marcado con un radiomarcador, una inmunotoxina o toxina, o es una proteína de fusión que comprende un péptido tóxico. El anticuerpo anti-M-CSF o la proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-M-CSF dirige el radiomarcador, inmunotoxina, toxina o péptido tóxico hacia la célula que expresa M-CSF. En una realización preferida, el radiomarcador, inmunotoxina, toxina o péptido tóxico se internaliza después de que el anticuerpo anti-M-CSF se liga al M-CSF sobre la superficie de la célula blanco.

[0268] En otro aspecto, el anticuerpo anti-M-CSF puede usarse para tratar estados no cancerosos en los cuales elevados niveles de M-CSF y/o M-CSF han sido asociados con el estado o enfermedad no canceroso. En una realización, el método comprende la etapa de administrar una anticuerpo anti-M-CSF a un paciente que tiene un estado patológico no canceroso causado o exacerbado por elevados niveles de M-CSF y/o niveles o actividad de M-CSF. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-M-CSF identifica el progreso del estado patológico no canceroso. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-M-CSF detiene o invierte, al menos en parte, el estado patológico no canceroso.

Terapia con genes

[0269] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden administrarse a un paciente que lo necesita vía terapia con genes. La terapia puede ser o *in vivo* o *ex vivo*. En una realización preferida, se administran a un paciente moléculas de ácido nucleico que codifican ambas, una cadena pesada y una cadena liviana. En una realización más preferida, las moléculas de ácido nucleico se administran de modo tal que se integran en forma estable en los cromosomas de células B, debido a que estas células están especializadas para producir anticuerpos. En una realización preferida, células B precursoras se transfectan o infectan *ex vivo* y se re-transplantan en un paciente que lo necesita. En otra realización, células B precursoras u otras células se infectan *in vivo* usando un virus conocido por infectar el tipo celular de interés. Vectores típicos usados para terapia con genes incluyen liposomas, plásmidos y vectores virales. Vectores virales típicos son retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados. Después de la infección *in vivo* o *ex vivo*, pueden monitorearse los niveles de expresión del anticuerpo tomando una muestra del paciente tratado y usando cualquier inmunoensayo conocido en el arte o discutido en ésta.

[0270] En una realización preferida, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-M-CSF y expresar la molécula de ácido nucleico. En otra realización, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-M-CSF y expresar la molécula de ácido nucleico. En un método más preferido, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena liviana o la porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-M-CSF de la invención y expresar las moléculas de ácido nucleico. El método de terapia con genes también puede comprender la etapa de administrar otro agente anti-cáncer, tales como taxol o adriamicina.

[0271] Con el fin de un mejor entendimiento de esta invención, se exponen los ejemplos siguientes. Estos ejemplos tienen solamente el propósito de ilustración y no deben ser interpretados como limitativos de cualquier modo del alcance de la invención.

EJEMPLO I

Generación de líneas celulares que producen anticuerpos anti-M-CSF

[0272] Se prepararon, seleccionaron y ensayaron anticuerpos de la invención como sigue:

Inmunización y generación de hibridomas

Ratones XENOMOUSE™ de ocho a diez semanas se inmunizaron intraperitonealmente o en las plantas de sus patas traseras con M-CSF humano (10 µg/dosis/ratón). Esta dosis se repitió cinco a siete veces durante un período de tres a ocho semanas. Cuatro días antes de la fusión, se administró a los ratones una inyección final de M-CSF humano en PBS. Los linfocitos del bazo y del nodo linfático de los ratones inmunizados se fusionaron con la línea celular no secretoria del mieloma P3-X63-Ag8.653, y las células fusionadas se sometieron a selección en medio HAT como previamente descrito (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46, 1981). Se recuperó un panel de hibridomas, todos los cuales segregan anticuerpos IgG2 e IgG4 humanos específicos para M-CSF. También se generaron anticuerpos usando la tecnología XENOMAX™ según lo descrito en Babcook, J.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48, 1996. Para estudios adicionales se seleccionaron nueve líneas celulares producidas por ingeniería genética para producir anticuerpos de la invención y se designaron como 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4, 8.10.3 y 9.7.2.

[0272a] Los hibridomas fueron depositados de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), de 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, el 8 de Agosto de 2003. A los hibridomas les fueron asignados los siguientes números de acceso:

Hibridoma 3.8.3 (LN 15891)	PTA-5390
Hibridoma 2.7.3 (LN 15892)	PTA-5391
Hibridoma 1.120.1 (LN 15893)	PTA-5392
Hibridoma 9.7.2 (LN 15894)	PTA-5393
Hibridoma 9.14.4 (LN 15895)	PTA-5394
Hibridoma 8.10.3 (LN 15896)	PTA-5395
Hibridoma 88-gamma (UC 25489)	PTA-5396
Hibridoma 88-kappa (UC 25490)	PTA-5397
Hibridoma 100-gamma (UC 25491)	PTA-5398
Hibridoma 100-kappa (UC) 25492)	PTA-5399
Hibridoma 252-gamma (UC 25493)	PTA-5400
Hibridoma 252-kappa (UC 25494)	PTA-5401

EJEMPLO II

Análisis de genes utilizados

[0273] Se clonó DNA que codifica las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1,120.1, 9.14.4, 8.10.3 y 9.7.2 a partir de las líneas celulares de hibridoma respectivas y se determinaron las secuencias del DNA mediante métodos conocidos por los entendidos en el arte. Adicionalmente, el DNA de las líneas celulares de hibridoma 9.14.4, 8.10.3 y 9.7.2 se sometió a mutación en regiones de framework específicas en el dominio variable y/o se modificó el isotipo para obtener, por ejemplo, 9.14.4I, 8.10.3F y 9.7.2IF, respectivamente. A partir de la secuencia de los ácidos nucleicos y la secuencia de aminoácidos prevista de los anticuerpos, se identificaron los genes usados para cada cadena de anticuerpo ("VBASE"). La Tabla 2 indica los genes utilizados de anticuerpos seleccionados de acuerdo con la invención:

Tabla 2

Utilización de genes de cadenas pesadas y livianas

Clon	Cadena pesada				Cadena liviana kappa		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	SEQ ID NO:	V _K	J _K
252	1, 2	3-11	7-27	6	3, 4	O12	3
88	5, 6	3-7	6-13	4	7, 8	O12	3

Clon	Cadena pesada				Cadena liviana kappa		
100	9, 10	3-23	1-26	4	11, 12	L2	3
3.8.3	14	3-11	7-27	4	16	L5	3
2.7.3	18	3-33	1-26	4	20	L5	4
1.120.1	22	1-18	4-23	4	24	B3	1
9.14.4I	25, 26	3-11	7-27	4b	27, 28	O12	3
8.10.3F	29, 30	3-48	1-26	4b	31, 32	A27	4
9.7.2IF	33, 34	3-11	6-13	6b	35, 36	O12	3
9.14.4	37, 38	3-11	7-27	4b	27, 28	O12	3
8.10.3	29, 30	3-48	1-26	4b	43, 44	A27	4
9.7.2	45, 46	3-11	6-13	6b	47, 48	O12	3
8.10.3FG1	97, 98	3-48	1-26	4b	31, 32	A27	4
9.14.4G1	101, 102	3-11	7-27	4b	27, 28	O12	3
9.14.4C-Ser	54	3-11	7-27	4b	56	O12	3
9.14.4-CG2	74	3-11	7-27	4b	56	O12	3
9.14.4-CG4	78	3-11	7-27	4b	56	O12	3
8.10.3C-Ser	58	3-48	1-26	4b	60	A27	4
8.10.3-CG2	62	3-48	1-26	4b	60	A27	4
8.10.3-CG4	94	3-48	1-26	4b	60	A27	4
8.10.3-Ser	90	3-48	1-26	4b	43, 44	A27	4
9.7.2C-Ser	50	3-11	6-13	6b	52	O12	3
9.7.2-CG2	66	3-11	6-13	6b	52	O12	3
9.7.2-CG4	70	3-11	6-13	6b	52	O12	3
9.7.2-Ser	86	3-11	6-13	6b	47, 48	O12	3
9.14.4-Ser	82	3-11	7-27	4b	27, 28	O12	3

[0274] Se llevó a cabo mutagénesis de residuos específicos de las cadenas pesadas y livianas, diseñando cebadores y usando el Equipo para Mutagénesis Dirigida a un Sitio QuickChange de Stratagene, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación automática, y los insertos mutagenizados se subclonaron en vectores de expresión. Los vectores de expresión se transfectaron en células HEK293 para producir suficientes anticuerpos para la caracterización.

EJEMPLO III

Ensayo de proliferación de células monocíticas de ratón dependiente de M-CSF

[0275] Se condujeron ensayos *in vitro* para medir la proliferación de células monocíticas de ratón dependiente de M-CSF en la presencia de anticuerpos anti-M-CSF para determinar el grado de inhibición mediante anticuerpos anti-M-CSF.

[0276] Se obtuvieron células monocíticas de ratón, células M-NFS-60, de la colección American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) y las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 que contiene L-glutamina 2 mM (ATCC), 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) inactivado por calor, 2-mercaptoetanol 0,05 mM (Sigma, St. Louis MO) (medio de ensayo) con 15 ng/ml de M-CSF humano. Las células M-NSF-60 se escindieron a 5 x 10⁴ células para ser usadas el próximo día o a 2,5 x 10⁴ células para ser usadas en 2 días. Antes de usar las células en el ensayo, se lavaron tres veces con RPMI-1640, se contaron y se ajustó el volumen con medio de ensayo a 2 x 10⁵ células/ml. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en placas de cultivo de tejido

tratadas de 96 cavidades (Corning, Corning, NY). A cada cavidad se agregaron 50 μ l de las células lavadas, 100 pM o 1000 pM de M-CSF en un volumen de 25 μ l y un anticuerpo de ensayo o control en varias concentraciones en un volumen de 25 μ l de buffer de acetato (cloruro de sodio 140 mM, acetato de sodio 20 mM y 0,2 mg/ml de polisorbato 80, pH 5,5) hasta un volumen final de 100 μ l. Los anticuerpos de la invención se ensayaron solos y con M-CSF humano. Las placas se incubaron durante 24 horas (h) a 37°C con 5% de CO₂.

[0277] Después de 24 horas, se agregaron 10 μ l/cavidad de 0,5 μ Ci de ³H-timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y las células se pulsaron con la timidina durante 3 horas. Para detectar la cantidad de timidina incorporada, las células se cosecharon

sobre placas de filtro unifier GF/C pre-humedecidas (Packard, Meriden, CT) y se lavaron 10 veces con agua. Las placas se dejaron secar durante la noche. Se sellaron las salidas de fondo de las placas filtrantes. Luego, se agregaron 45 μ l de Microscint 20 (Packard, Meriden, CT) por cavidad. Después de sellar la parte superior, las placas se introdujeron en un contador microbeta Trilux (Wallac, Norton, OH) para el conteo.

[0278] Estos experimentos demuestran que los anticuerpos anti-M-CSF de la invención inhiben la proliferación de células monocíticas de ratón en respuesta a M-CSF. Además, usando varias concentraciones de anticuerpos, se determinó la IC₅₀ para la inhibición de la proliferación de células monocíticas de ratón para los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3 y 9.7.2 (ensayo de proliferación celular, Tabla 3a y Tabla 3b).

Tabla 3a

Anticuerpo	252	88	100	3.8.3	2.7.3	1.120.1
Ensayo de proliferación de células monocíticas de ratón dependiente de M-CSF [IC ₅₀ , M]	1,86 x 10 ⁻¹⁰	2,31 x 10 ⁻¹⁰	7,44 x 10 ⁻¹⁰	7,3 x 10 ⁻¹¹	1,96 x 10 ⁻¹⁰	1,99 x 10 ⁻¹⁰
Ensayo de activación de monocitos de la sangre entera humana [IC ₅₀ , M]	8,67 x 10 ⁻¹⁰	5,80 x 10 ⁻¹⁰	1,53 x 10 ⁻¹⁰	8,6 x 10 ⁻¹¹	7,15 x 10 ⁻¹⁰	8,85 x 10 ⁻¹⁰
Ensayo de inhibición de ligadura al receptor [IC ₅₀ , M]	7,47 x 10 ⁻¹⁰	4,45 x 10 ⁻¹⁰	1,252 x 10 ⁻⁹	7,0 x 10 ⁻¹¹	3,08 x 10 ⁻¹⁰	1,57 x 10 ⁻¹⁰

Tabla 3b

Anticuerpo	9.14.4I	8.10.3F	9.7.2IF	9.14.4	8.10.3	9.7.2
Ensayo de proliferación de células monocíticas de ratón dependiente de M-CSF [IC ₅₀ , M]	2,02 x 10 ⁻¹⁰	4,13 x 10 ⁻¹⁰	7,37 x 10 ⁻¹⁰	2,02 x 10 ⁻¹⁰	4,13 x 10 ⁻¹⁰	7,37 x 10 ⁻¹⁰
Ensayo de activación de monocitos de la sangre entera humana [IC ₅₀ , M]	2,49 x 10 ⁻¹⁰	4,46 x 10 ⁻¹⁰	1,125 x 10 ⁻⁹	6,48 x 10 ⁻¹⁰	2,8 x 10 ⁻¹⁰	1,98 x 10 ⁻¹⁰
Ensayo de inhibición de ligadura al receptor [IC ₅₀ , M]	2,97 x 10 ⁻¹⁰	9,8 x 10 ⁻¹¹	5,29 x 10 ⁻¹⁰	4,1 x 10 ⁻¹¹	1,5 x 10 ⁻⁹	6 x 10 ⁻¹²

EJEMPLO IV

Ensayo de activación de monocitos de la sangre entera humana

[0279] Se condujeron ensayos *in vitro* para medir los cambios de forma de monocitos dependientes de M-CSF en la presencia de anticuerpos anti-M-CSF para determinar si los anticuerpos anti-M-CSF eran capaces de inhibir la activación de monocitos de la sangre entera humana y su grado de inhibición de las modificaciones de la forma de los monocitos.

[0280] En cavidades individuales de una placa de cultivo de tejidos de 96 cavidades se mezclaron 6 μ l de anti-M-CSF 1,7 nM y 94 μ l de sangre humana entera para una concentración final de 102 pM del anticuerpo anti-M-CSF. Las placas se incubaron a 37°C en un incubador de cultivo de tejido en atmósfera de CO₂. Luego, las placas se sacaron del incubador. A cada cavidad se agregaron 100 μ l de una solución de fijador (0,05% de formalina en solución fisiológica buferada con fosfato sin MgCl₂ ó CaCl₂) y las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para cada muestra se mezclaron 180 μ l de cada cavidad y 1 ml de buffer de lisis de eritrocitos. Los tubos se agitaron durante 2 segundos con formación de vórtice. Luego, las muestras se incubaron a 37°C durante 5 minutos en un baño de agua con vibración para someter los eritrocitos a lisis, pero dejando intacto los monocitos. Inmediatamente después de esta incubación, las muestras se leyeron en un aparato de barrido de células activadas por fluorescencia

(FACS) (FACS BD Beckman) y los datos se analizaron utilizando la versión 3.4 del software para el aparato FACS.

[0281] Estos experimentos demostraron que los anticuerpos anti-M-CSF de la invención inhiben cambios de forma de monocitos en comparación con muestras de control. Usando el ensayo de cambio de forma de monocitos, se determinó la IC_{50} para los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3 y 9.7.2 (activación de monocitos en sangre entera humana, Tabla 3a y Tabla 3b).

EJEMPLO V

Ensayo de inhibición de ligadura al receptor *c-fms*

[0282] Se condujeron ensayos *in vitro* para medir la ligadura de M-CSF al receptor *c-fms* en la presencia de anticuerpos anti-M-CSF para determinar si los anticuerpos anti-M-CSF eran capaces de inhibir la ligadura de M-CSF al receptor *c-fms* y su grado de inhibición.

[0283] Se lavaron células NIH-3T3 transfectadas con células *c-fms* o M-NSF-60 humanas mantenidos en solución fisiológica de Dulbecco bufferada con fosfato sin magnesio o calcio. Las células NIH-3T3 se separaron de las placas de cultivo de tejidos con tetra-acetato de etilendiamina (EDTA) 5 mM, pH 7,4. Las células NIH-3T3 se volvieron al incubador para cultivo de tejidos durante 1-2 minutos y el frasco (los frascos) se golpeó (golpearon) ligeramente para aflojar las células. Las células NIH-3T3 y las células M-NSF-60 se transfirieron a tubos de 50 ml y se lavaron dos veces con buffer de reacción (1x RPMI sin bicarbonato de sodio que contiene ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico (HEPES) 50 mM, pH 7,4). Luego, las células NIH-3T3 se resuspendieron en buffer de reacción para una concentración final de $1,5 \times 10^5$ células/ml. Las células M-NSF-60 se resuspendieron en un buffer de reacción para una concentración final de $2,5 \times 10^6$ células/ml.

[0284] Para el ensayo, se mezclaron en un tubo para ligadura 9 μ l de una solución de sacarosa 0,4 M estéril, 100 μ l de 125 I-M-CSF (Amersham, IMQ7228v) a una concentración final de 200 pM en RPMI-1640 que contiene HEPES 50 mM (pH 7,4), 0,2% de albúmina de suero bovino y 100 μ l de M-CSF no marcado a una concentración final de 200 nM. Luego, se agregaron 50 μ l/tubo de concentraciones crecientes de un anticuerpo de ensayo. Con el fin de determinar la ligadura no específica de los anticuerpos, incluimos muestras a las cuales también agregamos M-CSF 200 nM. A los tubos de control no agregamos anticuerpo. Luego, por tubo se agregaron 15.000 células NIH-3T3 o 250.000 células M-NSF-60. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas y se sometieron a centrifugación a 10.000 rpm durante 2 min. Se cortaron las puntas de los tubos que contienen las pellas celulares y se determinó la cantidad de M-CSF ligado a las células usando un contador Gamma Packard Cobra II. Se determinó la ligadura específica substrayendo la ligadura no específica de la ligadura total. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se analizaron los datos de ligadura usando el programa de computación Graph Pad Prism 2.01.

[0285] Estos experimentos demuestran que los anticuerpos anti-M-CSF de la invención inhiben la ligadura de M-CSF al receptor *c-fms* en comparación con muestras de control. Además, usando varias concentraciones de anticuerpos, se determinó la IC_{50} para la inhibición de la ligadura al receptor para los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3, 1.120.1, 9.14.4I, 8.10.3F, 9.7.2IF, 9.14.4, 8.10.3 y 9.7.2 (ensayo de inhibición al receptor, Tabla 3a y Tabla 3b).

EJEMPLO VI

Determinación de constantes de afinidad (K_D) de anticuerpos monoclonales anti-M-CSF mediante BIACORE™

[0286] Se realizaron mediciones de afinidad de anticuerpos purificados mediante resonancia en la superficie de un plasmón usando el instrumento BIACORE™ 3000, siguiendo los protocolos del fabricante.

[0287] Para los anticuerpos 3.8.3, 2.7.3 y 1.120.1, los experimentos se realizaron en un instrumento BIACORE™ 3000 a 25°C en solución fisiológica bufferada con fosfato de Dulbecco que contiene 0,0005% de Tween-20. Las concentraciones de proteína se obtuvieron a partir de experimentos de velocidad de sedimentación o midiendo la longitud de onda de la muestra a 280 nm, usando coeficientes de extinción teóricos derivados de secuencias de aminoácidos. Para los experimentos que miden la ligadura del anticuerpo a antígenos inmovilizados, se inmovilizó M-CSF sobre un chip B1 mediante procedimientos

estándar de copulación directa con amina. Para los anticuerpos 3.8.3, 2.7.3 y 1.120.1 se prepararon muestras con una concentración de 0,69 µM. Estas muestras se diluyeron mediante una serie de 3 diluciones a 8,5 nM ó 2,8 nM para obtener concentraciones en la gama aproximada de 1:100. Para cada concentración, las muestras se inyectaron por duplicado con una velocidad de flujo de 5 µl/min durante 4 min. Se monitoreó la disociación durante 2000 segundos. Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de ligadura simple 1:1 usando el software BIACORE™ Biaevaluation. Este método se usó en todos los casos para obtener k_{off} y se encontró que este conjunto de datos se comparó bien con el obtenido a partir del ajuste global de los datos de asociación y disociación.

[0288] Para los anticuerpos 252, 88 y 100, los experimentos se realizaron en un instrumento BIACORE™ 3000 a 25°C en buffer HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% de agente tensoactivo Surfactant P20). Para los experimentos que miden la ligadura del anticuerpo a antígenos inmovilizados, se inmovilizó M-CSF sobre un chip sensor CM5 Research Grade Sensor mediante procedimientos estándar de copulación directa con amina. Las muestras de anticuerpos se prepararon con una concentración 12,5 nM para los anticuerpos 252 y 100 y con una concentración de 25,0 nM para el anticuerpo 88. Estas muestras se diluyeron mediante una serie de dos diluciones a 0,78 nM para obtener concentraciones en la gama aproximada de 1:15-30. Para cada concentración, las muestras se inyectaron por duplicado en orden aleatorio con una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 3 min. La disociación se monitoreó durante 300 seg. Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de ligadura simple 1:1 usando el software BIACORE™ Biaevaluation. Este método se usó en todos los casos para obtener k_{off} y se encontró que este conjunto de datos se comparó bien con el obtenido a partir del ajuste global de los datos de asociación y disociación.

[0289] La Tabla 4 muestra los resultados para los anticuerpos 252, 88, 100, 3.8.3, 2.7.3 y 1.120.1.

TABLA 4

	252	88	100	3.8.3	2.7.3	1.120.1
K_D (M)	$1,33 \times 10^{-11}$	$1,33 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-11}$	$4,0 \times 10^{-10}$	$4,7 \times 10^{-9}$	$5,4 \times 10^{-9}$
k_{off} (1/s)	$1,03 \times 10^{-6}$	$7,3 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-5}$			

EJEMPLO VII

Producción de anticuerpos 8.10.3 a partir de células hibridoma 8.10.3

[0290] Se produjo el anticuerpo 8.10.3 en frascos "sparged spinners" de 3L. El frasco "sparged spinner" de 3L es un recipiente de vidrio (N.del T.: frasco de vidrio con entradas laterales) en el cual se mezclan cultivos con un rotor controlado mediante una plataforma magnética (N.del T.: en lo sucesivo se hace referencia a "sparged spinner" como "frasco con rotor"). El frasco "spinner" se conecta a líneas de gas para proveer aire con 5% de CO₂. Las células hibridoma 8.10.3 se descongelaron inicialmente en frascos de cultivo celular T-25. Las células se expandieron progresivamente hasta que hubo un número suficiente de células para sembrar en los frascos con rotor (sparged spinners).

[0291] Dos frascos con rotor de 3L se sembraron con células hibridoma 8.10.3 en medio para hibridomas libre de suero con los agregados mencionados en la Tabla 5 para los dos frascos con rotor. Las concentraciones indicadas para suero IgG Ultra low (Gibco cat# 16250-078), L-glutamina (JRH Biosciences cat# 59202-500M), aminoácidos no esenciales (Gibco cat# 11140-050), Peptona (Difco cat# 211693), glucosa (solución patrón preparada en casa a partir de glucosa JT Baker cat# 1920-07), y agente anti-espumante C (Sigma cat.# A-8011) son las concentraciones finales en el medio. El balance de volumen en cada reactor es medio para hibridomas libre de suero.

TABLA 5. CONDICIONES PARA CULTIVAR HIBRIDOMAS 8.10.3 EN DOS FRASCOS CON ROTOR (SPARGED SPINNERS) DE 3L.

Condiciones	Spinner 1	Spinner 2
Densidad de sembrado (1×10^6 células/ml)	0,16 ml	0,16 ml
Medio para hibridomas libre de suero (Gibco cat# 12045-076)	Balance	Balance
Suero IgG Ultra low (Gibco cat# 16250-078)	5%	5%
L-glutamina (JRH Biosciences cat# 59202-500M)	8 mmol/L	8mmol/L

Condiciones	Spinner 1	Spinner 2
Aminoácidos no esenciales (Gibco cat# 11140-050)	1%	1%
Peptona (Difco cat# 211693)	1g/L	1g/L
Glucosa 2 M (patrón preparado en casa a partir de JT Baker cat# 1920-07)	8g/L	8g/L
Agente anti-espumante C (Sigma cat.# A-8011)	1ml/L	1ml/L

[0292] Los cultivos se cultivaron durante 15 días y se cosecharon cuando la viabilidad era menor de 20%. La viabilidad se determinó mediante el método de exclusión con azul tripano con un contador de células automático (Cedex, Innovatis). La recolección se realizó mediante centrifugación y filtración subsecuente. Después de una centrifugación durante 15 minutos a 7000 rpm y filtración subsecuente por un filtro estéril Millipore Opticap 4" de 0,22 μ m (cat# KVSCO4HB3) en una bolsa estéril TC-Tech de 10L (cat # P/N 12420 Bag Style CC-10-112420). Luego el filtrado se purificó según lo indicado en el ejemplo siguiente.

EJEMPLO VIII

Purificación de un anticuerpo anti-M-CSF

[0293] Se preparó una columna de proteína A (Amersham Pharmacia) mediante el lavado con 3 volúmenes de columna de urea 8 M, seguido por un lavado de equilibración con Tris 20 mM (pH 8). Al filtrado final del Ejemplo VII se agregaron 2% v/v de Tris 1 M pH 8,3 y 0,02% de NaN_3 antes de cargarlo en la columna de proteína A vía el método de goteo por gravedad. Después de completar la carga, la resina se lavó con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM (pH 8), seguido por 5 volúmenes de columna del buffer de elución (glicina 0,1 M, pH 3,0). Se anotó cualquier precipitación y luego se agregó al anticuerpo eluido un agregado de 10% v/v de Tris 1 M, pH 8,3. Luego, la proteína eluida se dializó en un volumen de buffer de diálisis (NaCl 140 mM / acetato de sodio 20 mM, pH 5,5) 100 veces mayor que la cantidad del material eluido. A continuación del diálisis, el anticuerpo se filtró estéril con un filtro de 0,22 μ m y se almacenó hasta uso posterior.

EJEMPLO IX

Tratamiento de monos y conteos de monocitos

[0294] A un mono cynomologus macho y uno hembra por grupo de dosificación se administró intravenosamente vehículo o anticuerpo 8.10.3 (producido según lo descrito en los Ejemplos VII y VIII) en una dosis de 0; 0,1; 1 ó 5 mg/kg en un volumen de dosis de 3,79 mL/kg durante un periodo de aproximadamente 5 minutos. Las muestras de sangre para el análisis en el laboratorio clínico se recolectaron a las 24 y 72 horas después de la administración de la dosis y semanalmente durante 3 semanas. Los conteos de monocitos se determinaron mediante dispersión de la luz usando un sistema Cell Dyn de Abbott Diagnostics Inc. (Abbott Park, Illinois).

[0295] Con todas las dosis se observó una disminución (~25% a 85%) del total de monocitos en relación con la dosis administrada (Figuras 1A y 1B). A la semana 2, los conteos de monocitos con las dosis de 0,1 y 1 mg/kg parecen rebotar hasta niveles cercanos al control, mientras que los conteos de monocitos con la dosis de 5 mg/kg siguen disminuyendo a la semana 3.

Análisis del subconjunto de monocitos CD14+CD16+

[0296] Se extrajo sangre entera de primates en tubos Vacutainer que contienen heparina sódica. 0,2 ml de cada muestra de sangre se agregaron a un tubo de centrifuga cónico de polipropileno de 15 ml que contiene 10 ml de buffer de lisis de eritrocitos (Sigma), y se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Luego los tubos se centrifugaron en una centrifuga Sorvall RT7 durante 5 minutos a 1.200 rpm. El sobrenadante se aspiró, la pella se resuspendió en 10 ml de buffer FACS a 4°C (solución salina balanceada de Hank / 2% de FBS / 0,02% de azida sódica), y el tubo se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 1.200 rpm. El sobrenadante se aspiró y la pella se resuspendió en un cóctel de anticuerpos que consiste de 80 μ l de buffer FACS a 4°C, 10 μ l de anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano conjugado con FITC (BD Biosciences, San Diego, CA), 0,5 μ l de anticuerpo monoclonal anti-CD16 humano conjugado con Cy5-PE (BD Biosciences, San Diego, CA), y 10 μ l de anticuerpo monoclonal anti-CD89 humano conjugado con PE (BD Biosciences, San Diego, CA). La suspensión celular se incubó sobre hielo durante 20 minutos, después de lo cual se agregaron 10 ml de buffer FACS a 4°C y las células se centrifugaron como anteriormente. El sobrenadante se

aspiró, y la pella celular se resuspendió en 400 μ l de buffer FACS y las células se analizaron con un citómetro de flujo FACSCaliber (BD Biosciences, San Jose, CA). Para cada muestra se recolectaron datos para 30.000 células.

[0297] La población de monocitos se identificó mediante una combinación de mediciones de la dispersión de la luz delante (forward) y a un ángulo de 90° (ortogonal) de la luz incidente. Las células del tipo monocito se analizaron adicionalmente por la expresión de CD14 y CD16. Se observaron dos poblaciones distintas de monocitos, una que expresa elevados niveles de CD14 con poca o ninguna expresión de CD16 (CD14++CD16-) y la otra que expresa niveles menores de CD14, pero niveles elevados de CD16 (CD14+CD16+), similar a los dos subconjuntos de monocitos descritos previamente en sangre periférica humana (Ziegler-Heitbrock H.W., *Immunology Today* 17:424-428 (1996)). Para cada primate ensayado se determinó el porcentaje de monocitos dentro del subconjunto CD14+CD16+, después de cada extracción de sangre realizada los días 1, 3, 7, 14 y 21 después de la inyección de 8.10.3.

[0298] En general, el tratamiento con 8.10.3 resultó en una reducción del porcentaje de monocitos CD14+CD16+ (vea Figuras 2A y 2B). Los monos que no recibieron anticuerpo 8.10.3 mostraron niveles de monocitos CD14+CD16+ relativamente estables. Los monocitos CD14+CD16+ recibieron la denominación "proinflamatorios" debido a que producen niveles mayores de TNF- α y otras citoquinas inflamatorias (Frankenberger, M.T., *et al.*, *Blood* 87:373-377 (1996)). También se informó que la diferenciación entre los monocitos CD14++CD16- del fenotipo convencional y aquellos del fenotipo proinflamatorio depende del M-CSF (Saleh M.N., *et al.*, *Blood* 85: 2910-2917 (1995)).

EJEMPLO X

Tratamiento de monos y conteos de monocitos

[0299] A tres monos cynomologus machos por grupo de dosificación se administró intravenosamente vehículo (acetato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 140 mM), anticuerpo 8.10.3F purificado o anticuerpo 9.14.4I purificado con una dosificación de 0, 1 ó 5 mg/kg en un volumen de dosificación de 3,79 mL/kg durante un periodo de aproximadamente 5 minutos. Los monos tenían una edad de 4 a 9 años y pesaron de 6 a 10 kg. Los días 2, 4, 8, 15, 23 y 29 después de la administración se recolectaron muestras de sangre para su análisis en el laboratorio clínico. Los conteos de monocitos se determinaron mediante dispersión de la luz usando un sistema Cell Dyn de Abbott Diagnostics Inc. (Abbott Park, Illinois).

[0300] Se observó una disminución del cambio porcentual del número total de monocitos para todas las dosis de anticuerpo 8.10.3F y anticuerpo 9.14.4I en comparación con los niveles de monocitos previo al ensayo (Figuras 3A y 3B) (vea, por ejemplo, día 4, 8, 15 y 23 en Figuras 3A y 3B).

[0301] Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en ésta por referencia, como si hubiese sido indicado específicamente e individualmente para cada publicación o solicitud de patente. A pesar de que la invención precedente se describió a modo de ilustración en forma detallada y se dieron ejemplos con el propósito de claridad de entendimiento, será fácilmente aparente para los entendidos en el arte que en base a las enseñanzas de esta invención pueden efectuarse ciertos cambios y modificaciones a la misma, sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la M-CSF, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

a) una cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 30 (residuos 45-54, 69-85 y 118-129, respectivamente) y una cadena liviana que comprende las secuencias de amino ácido de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 32 (residuos 44-55, 71-77 y 110-118, respectivamente), o

b) una cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 26 (residuos 45-54, 69-85 y 118-123, respectivamente) y una cadena liviana que comprende las secuencias de amino ácido de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 28 (residuos 46-56, 72-78 y 111-119, respectivamente).

2. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 30 (residuos 20-141) o SEQ ID NO: 26 (residuos 20-135).

3. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena liviana en la SEQ ID NO: 32 (residuos de 21 a 129) o SEQ ID NO: 28 (residuos 23-130).

4. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada y liviana son las siguientes:

a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 30 (residuos 20-141) y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena liviana en la SEQ ID NO: 32 (residuos 21-129), o

b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 26 (residuos 20-135) y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena liviana en la SEQ ID NO: 28 (residuos de 23 a 130).

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 sin la secuencia de señales de residuos de 1-19, y en donde la cadena liviana consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 sin la secuencia de la señal de los residuos 10-20.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 sin la secuencia de señales de los residuos 1-19, y en donde la cadena liviana consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 sin la secuencia de señales de los residuos 1-22.

7. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una línea de células aisladas caracterizada porque produce el anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Una línea de células aisladas que produce un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno de la misma que se une específicamente a la M-CSF, caracterizada porque el anticuerpo se compone de:

a) una cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 30 (residuos 45-54, 69-85 y 118-129, respectivamente) y una cadena liviana que comprende las secuencias de amino ácido de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 32 (residuos 44-55, 71-77 y 110-118, respectivamente), o

b) una cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 26 (residuos 45-54, 69-85 y 118-123, respectivamente) y una cadena liviana que comprende las secuencias de amino ácido de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 28 (residuos 46-56, 72-78 y 111-119, respectivamente).

10. Una molécula de ácido nucleico aislada caracterizada porque comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada, o una porción de unión al antígeno del mismo, o tanto la cadena pesada y la cadena liviana, o una porción de unión al antígeno del mismo, del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque el vector comprende una secuencia de control de la expresión unida operativamente a dicha molécula de ácido nucleico.

12. Una célula huésped aislado caracterizada porque comprende el vector según la reivindicación 11 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.

13. La célula huésped aislada según la reivindicación 12 caracterizada porque comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana del anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

14. Un método para hacer un anticuerpo anti-M-CSF o parte de unión al antígeno del mismo, caracterizado porque comprende:

1) cultivar la célula huésped según la reivindicación 12 o la línea celular según la reivindicación 8 por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de los anticuerpos o parte de la célula huésped o línea celular y

2) recuperar el anticuerpo o porción utilizando métodos de purificación de proteínas.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025779

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2011 - 07:06:44

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430543094	22/03/2011	89.032.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. LINDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	86.000.00	86.000.00
		1608 N. CREACION PRORROGA DE TERMINOS O PLAZO ADICIONAL		\$86.000.00

SON: **OCHENTA Y SEIS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496- -00007-0000

Fecha: 2011-03-30 17:01:56 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 444 RESPUESTA REQUE Folios: 65

0010:15777-841-001-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 23 de 2011 - 07:06:55

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025949

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2011 - 07:06:44

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430543094	22/03/2011	89.032.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496- -00007-0000

Fecha: 2011-03-30 17:01:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 65

0010: 15777-841-001-3
0010: 00557-234-019-7

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 23 de 2011 - 07:07:01

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0025958

Bogotá D.C., Marzo 23 de 2011 - 07:06:44

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430543094	22/03/2011	89.032.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20.000.00	20.000.00
				\$20.000.00

SON: **VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496- -00007-0000

Fecha: 2011-03-30 17:01:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 65

COLO: 15777-841-001-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 23 de 2011 - 07:07:01

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0028066

Bogotá D.C., Marzo 29 de 2011 - 07:07:02

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	157700675	28/03/2011	65.222.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496- -00007-0000

Fecha: 2011-03-30 17:01:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 65

0010:15777-841-001-3

Sede Contro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 29 de 2011 - 07:07:17