06-76955

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

BT

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT.

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 06-76955

54. **TÍTULO** ANTICUERPO MONOCLONAL M-CSF ESPECIFICOS Y USOS DE ESTOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C07K 16/00.

71. **SOLICITANTE** 1. CHIRON CORPORATION. 2. XOMA TECHNOLOGY Ltda

DOMICILIO 1. Emeryville, C.A. USA, 2. Hamilton, B.M.

74. **APODERADO** Otilia María Rodríguez D'Aleman.

22. **BOGOTÁ, D. C.,** Agosto 3/06.

(FORMA P-10)

PETIT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-076955- -00000-0000
Fec: 2006-08-04 16:06:41 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Cve: 378 FASCNACIONALI
Art 411 PRESENTACION Entins: 529

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONÀL 07/08/06

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	**Nombre: 1. CHIRON CORPORATION 2. XOMA TECHNOLOGY LTD.** **Dirección: . Intellectual Property R-338, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 USA; 2. Clarendon House, 2 Church Street, Hamilton HM11 (BM)** **Nacionalidad o domicilio: 1. Emeryville, CA, Estados Unidos 2. Hamilton, Bermuda** **Lugar de constitución: 1. Emeryville, California, USA 2. Hamilton, Bermuda**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☐ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **Cual** _____ **NÚMERO** _____
	Teléfono: Fax: **E. Mail:**	
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** ☒ **NIT:** ☐ **C.E.** ☐ **OTRO** ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	**Nombre: 1. LIU, Cheng; 2. ZIMMERMAN, Deborah,Lee; 3. HARROWE, Gregory, Martin; 4. KOTHS, Kiraton; 5. KAVANAUGH, William, Michael; 6. LONG, Li; 7. CALDERON-CACIA, Maria; 8. HORWITZ, Arnold, H.** **Dirección: 1. a 7: C/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662, USA; 8. 2720 Lakeview Drive, San Leandro, CA 94577, USA** **Nacionalidad o Domicilio: 1-5 Estadounideses; 6. Canadiense; 7-8 Estadounidenses**	

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2005/000546 Fecha: ENERO 6, 2005

Publicación Internacional No. WO 2005/068503 A2 Fecha: JULIO 28, 2005

6)Título (54) ANTICUERPO MONOCLONAL M-CSF ESPECÍFICO Y USOS DE ÉSTOS

7) Clasificación Internacional: C07K 16/00

8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐	**33) País de Origen**	**(32) Fecha**	**(31) Número de Solicitud**
	Estados Unidos	**Enero 7, 2004**	**60/535,181**
	Estados Unidos	**Juni 2, 2004**	**60/576,417**

9) Comprobante de pago N°. 06-52,009 Fecha: Juil 10, 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- [x] Poderes, si fuera el caso – CHIRON CORPORATION
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros:

1. Reporte internacional de búsqueda

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

P.810. 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-076955- -00000-0000
Fec: 2006-06-04 16:06:41 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Cve: 378 FASCNACIONALI
Act 411 PRESENTACION
Folios: 529

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 52,009
FECHA : JULIO 10 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBCONSIGNACION		BANCO POPULAR	050-00110-6	49045934	10/07/2006	6,249,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
28 July 2005 (28.07.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/068503 A2

(51) International Patent Classification[7]: C07K 16/00

(21) International Application Number:
PCT/US2005/000546

(22) International Filing Date: 6 January 2005 (06.01.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/535,181 7 January 2004 (07.01.2004) US
60/576,417 2 June 2004 (02.06.2004) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: CHIRON CORPORATION [US/US]; Intellectual Property R-338, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). XOMA TECHNOLOGY LTD.; Clarendon House, 2 Church Street, Hamilton HM11 (BM).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: LIU, Cheng [US/US]; c/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). ZIMMERMAN, Deborah, Lee [US/US]; c/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). HARROWE, Gregory, Martin [US/US]; c/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). KOTHS, Kirston [US/US]; c/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). KAVANAUGH, William, Michael [US/US]; c/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). LONG, LI [CA/US]; c/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). CALDERON-CACIA, Maria [US/US]; c/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US). HORWITZ, Arnold, H. [US/US]; 2720 Lakeview Drive, San Leandro, CA 94577 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2005/068503 A2

(54) Title: M-CSF-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND USES THEREOF

(57) Abstract: M-CSF-specific RX1-based or RX-1 derived antibodies are provided, along with pharmaceutical compositions containing such antibody, kits containing a pharmaceutical composition, and methods of preventing and treating bone loss in a subject afflicted with an osteolytic disease.

5

M-CSF-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND USES THEREOF

This application claims priority of U.S. Provisional Application No. 60/535,181, filed January 7, 2004, and U.S. Provisional Application No. 60/576,417 filed June 2, 2004, each of which is incorporated by reference herein in its entirety.

TECHNICAL FIELD

This invention relates to methods for preventing and treating osteolysis, cancer metastasis and bone loss associated with cancer metastasis by administering an M-CSF-specific antibody to a subject.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cancer metastasis is the primary cause of post-operation or post-therapy recurrence in cancer patients. Despite intensive efforts to develop treatments, cancer metastasis remains substantially refractory to therapy. Bone is one of the most common sites of metastasis of various types of human cancers (e.g., breast, lung, prostate and thyroid cancers). The occurrence of osteolytic bone metastases causes serious morbidity due to intractable pain, high susceptibility to fracture, nerve compression and hypercalcemia. Despite the importance of these clinical problems, there are few available treatments for bone loss associated with cancer metastasis.

Osteoclasts mediate bone readsorption. Osteoclasts are multinucleated cells differentiating from haemopoietic cells. It is generally accepted that osteoclasts are formed by the fusion of mononuclear precursors derived from haemopoietic stem cells in the bone marrow, rather than incomplete cell divisions (Chambers, Bone and Mineral Research, 6: 1-25, 1989; Göthling et al., Clin Orthop Relat R. 120: 201-228, 1976; Kahn et al., Nature 258: 325-327, 1975, Suda et al., Endocr Rev 13: 66-80, 1992; Walker, Science 180: 875, 1973; Walker, Science 190: 785-787, 1975; Walker, Science 190: 784-785, 1975). They share a common stem cell with monocyte-macrophage lineage cells (Ash et al., Nature 283: 669-670, 1980, Kerby et al., J. Bone Miner Res 7: 353-62, 1992). The differentiation of osteoclast precursors into mature multinucleated osteoclasts requires different factors including hormonal and local stimuli (Athanasou et al., Bone Miner 3: 317-333, 1988; Feldman et al., Endocrinology 107: 1137-1143, 1980; Walker, Science 190: 784-785, 1975; Zheng et al., Histochem J 23: 180-188, 1991) and living bone and bone cells have been shown to play a critical role in osteoclast development (Hagenaars et al., Bone Miner 6: 179-189, 1989). Osteoblastic or bone marrow stromal cells are also required for osteoclast differentiation.

One of the factors produced by these cells that supports osteoclast formation is macrophage-colony stimulating factor, M-CSF (Wiktor-Jedrzejczak et al., Proc Natl Acad Sci USA 87: 4828-4832, 1990; Yoshida et al., Nature 345: 442-444, 1990). Receptor activator for NF-κ B ligand (RANKL, also known as TRANCE, ODF and OPGL) is another signal (Suda et al., Endocr Rev 13: 66-80, 1992) through which osteoblastic/stromal cells stimulate osteoclast formation and resorption via a receptor, RANK (TRANCER), located on osteoclasts and osteoclast precursors (Lacey et al., Cell 93: 165-176, 1998; Tsuda et al., Biochem Biophys Res Co 234: 137-142, 1997; Wong et al., J Exp Med 186: 2075-2080, 1997; Wong et al., J Biol. Chem 272: 25190-25194, 1997; Yasuda et al., Endocrinology 139: 1329-1337, 1998; Yasuda et al., Proc Natl Acad Sci US 95: 3597-3602, 1998). Osteoblasts also secrete a protein that strongly inhibits osteoclast formation called osteoprotegerin (OPG, also known as OCIF), which acts as a decoy receptor for the RANKL thus inhibiting the positive signal between osteoclasts and osteoblasts via RANK and RANKL.

Osteoclasts are responsible for dissolving both the mineral and organic bone matrix (Blair et al., J Cell Biol 102: 1164-1172, 1986). Osteoclasts represent terminally differentiated cells expressing a unique polarized morphology with specialized membrane areas and several membrane and cytoplasmic markers, such as tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) (Anderson et al. 1979), carbonic anhydrase II (Väänänen et al., Histochemistry 78: 481-485, 1983), calcitonin receptor (Warshafsky et al., Bone 6: 179-185, 1985) and vitronectin receptor (Davies et al., J Cell Biol 109: 1817-1826, 1989). Multinucleated osteoclasts usually contain less than 10 nuclei, but they may contain up to 100 nuclei being between 10 and 100 μm in diameter (Göthling et al., Clin Orthop Relat R 120: 201-228, 1976). This makes them relatively easy to identify by light microscopy. They are highly vacuolated when in the active state, and also contain many mitochondria, indicative of a high metabolic rate (Mundy, in Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, pages 18-22, 1990). Since osteoclasts play a major role in osteolytic bone metastases, there is a need in the art for new agents and methods for preventing osteoclast stimulation and function.

Thus, there remains a need in the art to identify new agents and methods for preventing or treating osteolysis or cancer metastasis, including osteolytic bone metastases.

SUMMARY OF THE INVENTION

The materials and methods of the present invention fulfill the aforementioned

and other related needs in the art. In one embodiment of the invention, a non-murine monoclonal antibody is provided, including functional fragment, that specifically binds to the same epitope of M-CSF as any one of murine monoclonal antibody RX1, MC1, or MC3 having the amino acid sequences set forth in Figures 4, 14, and 15, respectively. In a related embodiment, an aformentioned antibody is provided wherein the antibody is selected from the group consisting of a polyclonal antibody; a monoclonal antibody including a Human Engineered™ antibody; a humanized antibody; a human antibody; a chimeric antibody; Fab, F(ab')2; Fv; Sc Fv or SCA antibody fragment; a diabody; linear antibody; or a mutein of any one of these antibodies, that preferably retain binding affinity of at least 10^{-7}, 10^{-8} or 10^{-9} or higher. A non-murine monoclonal antibody, including functional fragment, that competes with monoclonal antibody RX1, MC1, and/or MC3 having the amino acid sequence set forth in Figure 4 for binding to M-CSF by more than 75%, is also contemplated.

In another embodiment, a non-murine monoclonal antibody, including functional fragment, wherein said non-murine monoclonal antibody or functional fragment thereof binds an epitope of M-CSF that includes at least 4, 5, 6, 7 or 8 contiguous residues of amino acids 98-105 of Figure 12 is provided.

In another embodiment, the invention provides a non-murine monoclonal antibody, including functional fragment, wherein said non-murine monoclonal antibody or functional fragment thereof binds an epitope of M-CSF that includes at least 4, 5, 6, 7 or 8 contiguous residues of amino acids 65-73 or 138-144 of Figure 12 (corresponding to M-CSF epitopes recognized by 5H4 or MC3).

In yet another embodiment, the aforementioned antibody or fragment that binds an epitope of M-CSF that includes amino acids 98-105 of Figure 12 is provided. In a related embodiment, the aforementioned antibody is provided comprising CDR3 of Figure 4A. In another embodiment, the antibody is provided comprising at least 1, 2, 3, 4, 5, or 6 CDRs of murine antibody RX1 set forth in Figure 4A. Such an antibody that comprises at least 1, 2, 3, 4, or 5 CDRs of murine antibody RX1 may also comprise at least 1, 2, 3, 4, or 5 CDRs of any of the 6 CDRs of antibody 5H4 set forth in Figure 16A-B. Alternatively, the antibody that comprises at least 1, 2, 3, 4, or 5 CDRs of murine antibody RX1 may also comprise at least 1, 2, 3, 4, or 5 CDRs of any of the 6 CDRs of antibody MC1 set forth in Figure 16A-B. In yet another alternative, the aforementioned antibody may also comprise at least 1, 2, 3, 4, or 5 CDRs of any of the 6 CDRs of antibody MC3 set forth in Figure 16A-B. In a related embodiment, the antibody that comprises at least 1, 2, 3, 4, or 5 CDRs of murine

antibody RX1 may comprise at least 1, 2, 3, 4 or 5 CDRs of the consensus CDRs set forth in Figure 16A-B is provided. In still another related embodiment, in the aforementioned antibody one or more residues of the consensus CDR(s) is substituted by the corresponding residue of any of the CDRs of antibody murine RX1, 5H4, MC1 or MC3. The desired binding affinity may be retained even though one or more of the amino acids in the antibody have been mutated, e.g. by conservative substitutions in the CDRs, and/or conservative or non-conservative changes in the low and moderate risk residues.

In another embodiment of the invention, variants of the aforementioned antibody are provided, comprising a variable heavy chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% homologous to the amino acid sequence set forth in Figures 4A, 13, 14, or 15. In a related embodiment, the antibody comprises a variable light chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% homologous to the amino acid sequence set forth in Figures 4A, 13, 14, or 15.

In yet another embodiment, the antibody comprises a constant region and one or more heavy and light chain variable framework regions of a human antibody sequence. In a related embodiment, the antibody comprises a modified or unmodified constant region of a human IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4. In a preferred embodiment, the constant region is human IgG1 or IgG4, which may optionally be modified to enhance or decrease certain properties. In the case of IgG1, modifications to the constant region, particularly the hinge or CH2 region, may increase or decrease effector function, including ADCC and/or CDC activity. In other embodiments, an IgG2 constant region is modified to decrease antibody-antigen aggregate formation. In the case of IgG4, modifications to the constant region, particularly the hinge region, may reduce the formation of half-antibodies.

In yet another embodiment of the invention, the aforementioned antibody is derived from, based on, or contains part of a human consensus sequence, human germline sequence, human consensus germline sequence, or any one of the human antibody sequences in Kabat, NCBI Ig Blast, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi, Kabat Database http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html, FTP site for Kabat Release 5.0 (1992) ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Rel5.0/, ImMunoGeneTics database (Montpellier France) http://imgt.cnusc.fr:8104/, V-Base http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901, Zurich University http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html, The Therapeutic Antibody Human

Homology Project (TAHHP) http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Domains http://how.to/AnalyseAntibodies/, Humanization by design http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/, Antibody Resources http://www.antibodyresource.com/educational.html, Antibody Engineering (by TT Wu), Humana Press.

In a preferred aspect of the invention, the aforementioned antibody is a Human Engineered™ antibody. For example, the Human Engineered™ antibody sequence is any one of the sequences set forth in Figures 23-24. Other Human Engineered™ antibodies or variants thereof are contemplated.

For example, in one embodiment, the aforementioned RX1-based antibody is provided, wherein the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence $X_1VX_2LX_3EX_4GX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}LX_{14}LX_{15}CX_{16}VX_{17}DYSITSDYAWNWIX_{18}QX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{24}WMGYISYSGSTSX_{25}NX_{26}X_{27}LX_{28}X_{29}X_{30}IX_{31}IX_{32}RX_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}FX_{39}LX_{40}LX_{41}X_{42}VX_{43}X_{44}X_{45}DX_{46}AX_{47}YYCASFDYAHAMDYWGX_{48}GTX_{49}VX_{50}VX_{51}X_{52}$ (SEQ ID NO: 124), wherein X is any amino acid. In a related embodiment, the antibody is provided wherein the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence $DVX_1LX_2EX_3GPX_4X_5VX_6PX_7X_8X_9LX_{10}LX_{11}CX_{12}VTDYSITSDYAWNWIRQX_{13}PX_{14}X_{15}KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKX_{16}RIX_{17}IX_{18}RX_{19}TX_{20}X_{21}NX_{22}FX_{23}LX_{24}LX_{25}X_{26}VX_{27}X_{28}X_{29}DX_{30}ATYYCASFDYAHAMDYWGX_{31}GTX_{32}VX_{33}VX_{34}X_{35}$ (SEQ ID NO: 125), wherein X is any amino acid.

In still another embodiment of the invention, the aforementioned antibody is provided, wherein the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence $X_1VQLQESGPGLVKPSQX_2LSLTCTVX_3DYSITSDYAWNWIRQFPGX_4X_5LEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX_6IX_7RDTSKNQFX_8LQLNSVTX_9X_{10}DTAX_{11}YYCASFDYAHAMDYWGQGTX_{12}VTVSS$ (SEQ ID NO: 126), wherein X is any amino acid. In a related embodiment, the antibody is provided, wherein the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence $DVQLQESGPGLVKPSQX_1LSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGX_2KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX_3IX_4RDTSKNQFX_5LQLNSVTX_6X_7DTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTX_8VTVSS$ (SEQ ID NO: 127), wherein X is any amino acid. In yet another embodiment, the antibody is provided wherein the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGS TSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTV TVSS (SEQ ID NO: 41). In still another embodiment, the antibody is provided wherein the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGS TSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO: 43).

In another embodiment of the invention, the aforementioned antibody is provided wherein the light chain variable region comprises the amino acid sequence

$X_1IX_2LX_3QX_4X_5X_6X_7X_8X_9VX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}VX_{15}FX_{16}CX_{17}AX_{18}QSIGTSIHWYX_{19}QX_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}PX_{25}LLIKYASEX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}IX_{30}X_{31}X_{32}FX_{33}GX_{34}GX_{35}GX_{36}X_{37}FX_{38}LX_{39}IX_{40}X_{41}VX_{42}X_{43}X_{44}DX_{45}ADYYCQQINSWPTTFGX_{46}GTX_{47}LX_{48}X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}$ (SEQ ID NO: 128), wherein X is any amino acid. In a related embodiment, the antibody is provided wherein the light chain variable region comprises the amino acid sequence

$X_1IX_2LX_3QX_4PX_5X_6LX_7VX_8PX_9X_{10}X_{11}VX_{12}FX_{13}CX_{14}ASQSIGTSIHWYQQX_{15}TX_{16}X_{17}SPRLLIKYASEX_{18}ISX_{19}IPX_{20}RFX_{21}GX_{22}GX_{23}GX_{24}X_{25}FX_{26}LX_{27}IX_{28}X_{29}VX_{30}X_{31}X_{32}DX_{33}ADYYCQQINSWPTTFGX_{34}GTX_{35}LX_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (SEQ ID NO: 129), wherein X is any amino acid. In yet another embodiment, the antibody is provided wherein the light chain variable region comprises the amino acid sequence

$X_1IX_2LTQSPX_3X_4LSVSPGERVX_5FSCRASQSIGTSIHWYQQX_6TX_7X_8X_9PRLLIKYASEX_{10}X_{11}X_{12}GIPX_{13}RFSGSGSGTDFTLX_{14}IX_{15}X_{16}VESEDX_{17}ADYYCQQINSWPTTFGX_{18}GTKLEIKRX_{19}$ (SEQ ID NO: 130), wherein X is any amino acid.

In another embodiment of the invention, the aforementioned antibody is provided wherein the light chain variable region comprises the amino acid sequence

$X_1IX_2LTQSPX_3X_4LSVSPGERVX_5FSCRASQSIGTSIHWYQQX_6TX_7X_8SPRLLIKYASEX_9ISGIPX_{10}RFSGSGSGTDFTLX_{11}IX_{12}X_{13}VESEDX_{14}ADYYCQQINSWPTTFGX_{15}GTKLEIKRX_{16}$ (SEQ ID NO: 131), wherein X is any amino acid. In a related embodiment, the antibody is provided wherein the light chain variable region comprises the amino acid sequence

$X_1IX_2LTQSPX_3X_4LSVSPGERVX_5FSCRASQSIGTSIHWYQQX_6TX_7X_8X_9PRLLIKYASESISGIPX_{10}RFSGSGSGTDFTLX_{11}IX_{12}X_{13}VESEDX_{14}ADYYCQQINSWPTTFGX_{15}GTKLEIKRX_{16}$ (SEQ ID NO: 132), wherein X is any amino acid. In yet another embodiment, the antibody is provided wherein the light chain variable region comprises the amino acid

sequence EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASESISGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 45).

In still another embodiment of the invention, the aforementioned antibody is provided wherein the light chain variable region comprises the amino acid sequence EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASERATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 47). In another embodiment, the antibody is provided, wherein the light chain variable region comprises the amino acid sequence EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASERISGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO: 48).

In another embodiment of the invention, the aforementioned antibody wherein at least one X is a corresponding amino acid within the amino acid sequence set forth in Figure 4A is provided. In a related embodiment, the antibody is provided wherein at least one X is a conservative substitution (according to Table 1) of a corresponding amino acid within the amino acid sequence set forth in Figure 4A. In yet another related embodiment, the antibody is provided wherein at least one X is a non-conservative substitution (according to Table 1) of a corresponding amino acid within the amino acid sequence set forth in Figure 4A. In still another embodiment of the invention, the antibody is provided wherein at least one X is a corresponding amino acid within a human antibody sequence.

The aforementioned Human Engineered™ antibody is derived from, based on, or contains part of the human antibody consensus sequence, human germline sequence, human consensus germline sequence, or any one of the human antibody sequences in Kabat, NCBI Ig Blast, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi, Kabat Database http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html, FTP site for Kabat Release 5.0 (1992) ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Rel5.0/, ImMunoGeneTics database (Montpellier France) http://imgt.cnusc.fr:8104/, V-Base http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901, Zurich University http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html, The Therapeutic Antibody Human Homology Project (TAHHP) http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Domains

http://how.to/AnalyseAntibodies/, Humanization by design
http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/, Antibody Resources
http://www.antibodyresource.com/educational.html, Antibody Engineering (by TT Wu), Humana Press.

In another embodiment of the invention, the aforementioned antibody wherein the Human Engineered™ antibody sequence is one of the sequences set forth in Figures 23-24 or 29-30 is provided. In another embodiment, the antibody comprises a variable heavy chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to one of the heavy chain amino acid sequences set forth in Figure 19B. In yet another embodiment, the antibody comprises a variable light chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to one of the light chain amino acid sequences set forth in any of Figures 20B-22B.

In yet another embodiment, the aforementioned antibody such as 5H4, MC1 or MC3 antibody with the sequences set forth in one of Figures 24C-24E is Human Engineered™ according to the methods set forth in Studnicka et al., U.S. Patent No. 5,766,886 and Example 4A herein, using the Kabat numbering set forth in Figures 24C-24E to identify low, moderate and high risk residues. In a related embodiment, the aforementioned antibody is provided wherein all of the low risk residues of either the heavy or light chain or both are modified, where necessary, to be the same residues as a human reference immunoglobulin sequence. Similarly, another embodiment of the invention provides the aforementioned antibody wherein all of the low + moderate risk residues of either the heavy or light chain or both are modified, where necessary, to be the same residues as a human reference immunoglobulin sequence. A heavy chain wherein all of the low risk residues have been modified may be combined with a light chain wherein all of the low and moderate risk residues have been modified, and vice versa. Similarly, an aforementioned Human Engineered™ light or heavy chain may be combined with a light or heavy chain of a humanized or chimeric antibody.

In still another embodiment, the antibody comprises a variable heavy chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to one of the heavy chain amino acid sequences described immediately above Human Engineered™ according to the Studnicka method. In yet another embodiment, the antibody comprises a variable light chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to one of the light chain

amino acid sequences described immediately above Human Engineered™ according to the Studnicka method.

In still another embodiment, an antibody is provided comprising a heavy chain as set forth above and a light chain as set forth above.

In yet another embodiment of the invention, the aforementioned antibody has an affinity Kd of at least 10[-7]. In a related embodiment, the antibody has an affinity Kd of at least 10[-9].

In another embodiment of the invention, the aforementioned antibody is provided which is a polyclonal antibody; a monoclonal antibody including a Human Engineered™ antibody; a humanized antibody; a human antibody; a chimeric antibody; Fab, F(ab')2, Fv, ScFv or SCA antibody fragment; a diabody; a linear antibody; or a mutein of any one of these antibodies. In a related embodiment, the monoclonal antibody is an isolated antibody.

In still another embodiment of the invention, an isolated nucleic acid is provded comprising a nucleic acid sequence encoding a light chain of the aforementioned antibody. In a related embodiment, the isolated nucleic acid comprises a heavy chain nucleic acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to the heavy chain nucleotide sequence set forth in Figures 4A, 13, 14, or 15. In yet another related embodiment, the isolated nucleic acid comprises a light chain nucleic acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% identical to the light chain nucleotide sequence set forth in Figures 4A, 13, 14, or 15.

In another embodiment, a vector comprising the aforementioned isolated nucleic acid is provided. In a related embodiment, the aforementioned vector is provided wherein the isolated nucleic acid is operably linked to a regulatory control sequence. In still another embodiment, a host cell is provided comprising the aforementioned vector.

Numerous methods are contemplated in the present invention. For example, a method of producing an aforementioned antibody is provided comprising culturing the aforementioend host cell such that the isolated nucleic acid is expressed to produce the antibody. In a related embodiment, the method further comprises the step of recovering the antibody from the host cell culture. In a related embodiment, an isolated antibody produced by the aforementioned method is provided.

A hybridoma that secretes an aforementioned antibody is also provided by the

present invention. Additionally, an aforementioned antibody that is conjugated to a toxin is provided.

In another embodiment of the invention, a pharmaceutical composition is provided comprising any one of the aforementioned antibodies and a pharmaceutically suitable carrier, excipient or diluent. In a related embodiment, the pharmaceutical composition further comprises a second therapeutic agent. In yet another related embodiment, the pharmaceutical composition is provided wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent. In still another related embodiment, the pharmaceutical composition is provided wherein the second therapeutic agent is a bisphosphonate. In another embodiment the second therapeutic agent is another antibody.

Antibodies of the present invention are contemplated to have numerous desirable characteristics for the treatment of diseases and disorders. In one embodiment of the ivention, the any one of aforementioned antibodies that binds to M-CSF for preventing a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis, wherein the antibody effectively reduces the severity of bone loss associated with the disease, is provided. Similarly, any one of aforementioned antibodies that binds to M-CSF is provided for treating a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis, wherein said antibody effectively reduces the severity of bone loss associated with the disease.

Numerous diseases and disorders are contemplated to be amenable to antibody-based treatment in the present invention. In one embodiment of the invention, the aforementioned antibody is provided wherein said disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased osteoclast activity, including endocrinopathies (hypercortisoliam, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidism), hypercalcemia, deficiency states (rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (malabsorption syndromes, chronic renal failure (renal osteodystrophy), chronic liver disease (hepatic osteodystrophy)), drugs (glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

In a related embodiment, the aforementioned antibody that binds to M-CSF is provided for preventing or treating metastatic cancer to bone, wherein the metastatic cancer is

breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia and lymphoma; head and neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, and cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; and skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

In another embodiment of the invention, a method of screening for an M-CSF-specific antibody is provided comprising the steps of contacting metastatic tumor cell medium, osteoclasts and a candidate antibody; detecting osteoclast formation, proliferation and/or differentiation; and identifying said candidate antibody as an M-CSF-specific antibody if a decrease in osteoclast formation, proliferation and/or differentiation is detected. Similarly, the aforementioned method is provided wherein said metastatic tumor cell medium includes tumor cells.

In another embodiment, the aformentioned method is provided wherein the contacting step (a) occurs in vivo, said detecting step (b) comprises detecting size and/or number of bone metastases, and the candidate antibody is identified as an M-CSF-specific antibody if a decrease in size and/or number of bone metastases is detected. In a related embodiment, the aforementioned method is provided further comprising the step of determining if the candidate antibody binds to M-CSF. Similarly, another embodiment of the invention provides the aforementioned method further comprising the step of determining if said candidate antibody inhibits interaction between M-CSF and its receptor M-CSFR.

In another embodiment of the invention, a method of identifying an M-CSF-specific antibody that can prevent or treat metastatic cancer to bone is provided, comprising the steps of: (a) detecting binding of a candidate antibody to an epitope of M-CSF that includes at least 4 contiguous residues of amino acids 98-105 of Figure 12; and (b) assaying the ability of said candidate antibody to prevent or treat metastatic cancer to bone *in vitro* or *in vivo*.

In another embodiment of the invention, a method of identifying an M-CSF-specific antibody that can prevent or treat metastatic cancer to bone is provided, comprising the steps of: (a) detecting binding of a candidate antibody to an epitope of M-CSF that

includes at least 4 contiguous residues of amino acids 65-73 or 138-144 of Figure 12 (corresponding to M-CSF epitopes recognized by 5H4 or MC3); and (b) assaying the ability of said candidate antibody to prevent or treat metastatic cancer to bone *in vitro* or *in vivo*.

In yet another embodiment of the invention, a method of altering a CDR of an antibody that binds an epitope of M-CSF that includes amino acids 98-105 of Figure 12 is provided comprising altering an amino acid within a CDR of the amino acid sequence set forth in Figure 4A and selecting for an antibody that binds M-CSF with an affinity Ka of at least 10[-7]. In another embodiment, a method of systematically altering up to 60% of the heavy chain amino acid sequence set forth in Figure 4A is provided comprising altering any of X1-X52 in the amino acid sequence $X_1VX_2LX_3EX_4GX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}LX_{14}LX_{15}CX_{16}VX_{17}DYSITSDYAWNWIX_{18}QX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{24}WMGYISYSGSTSX_{25}NX_{26}X_{27}LX_{28}X_{29}X_{30}IX_{31}IX_{32}RX_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}FX_{39}LX_{40}LX_{41}X_{42}VX_{43}X_{44}X_{45}DX_{46}AX_{47}YYCASFDYAHAMDYWGX_{48}GTX_{49}VX_{50}VX_{51}X_{52}$ (SEQ ID NO: 133), and testing an antibody comprising the altered amino acid sequence for binding to an epitope of M-CSF that includes amino acids 98-105 of Figure 12.

In a related embodiment, a method of systematically altering up to 60% of the light chain amino acid sequence set forth in Figure 4A is provided comprising altering any of X1-X52 in the amino acid sequence $X_1IX_2LX_3QX_4X_5X_6X_7X_8X_9VX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}VX_{15}FX_{16}CX_{17}AX_{18}QSIGTSIHWYX_{19}QX_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}PX_{25}LLIKYASEX_{26}X_{27}X_{28}X_{29}IX_{30}X_{31}X_{32}FX_{33}GX_{34}GX_{35}GX_{36}X_{37}FX_{38}LX_{39}IX_{40}X_{41}VX_{42}X_{43}X_{44}DX_{45}ADYYCQQINSWPTTFGX_{46}GTX_{47}LX_{48}X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}$ (SEQ ID NO: 134), and testing an antibody comprising the altered amino acid sequence for binding to an epitope of M-CSF that includes amino acids 98-105 of Figure 12.

In yet another embodiment of the invention, a method of altering a CDR of an antibody that binds an epitope of M-CSF that includes amino acids 65-73 or 138-144 of Figure 12 (corresponding to M-CSF epitopes recognized by 5H4 or MC3) is provided comprising altering an amino acid within a CDR of the amino acid sequence set forth in one of Figures 13, 14, and 15, and selecting for an antibody that binds M-CSF with an affinity Ka of at least 10[-7]. In another embodiment, a method of systematically altering up to 60% of the heavy chain amino acid sequence set forth in one of Figures 13, 14, and 15, is provided comprising altering the aforementioned sequences according to the methods set forth in Studnicka et al., U.S. Patent No. 5,766,886 and Example 4A herein, and according to the Kabat numbering set forth in figures 24C-24E, and testing an antibody comprising the altered

amino acid sequence for binding to an epitope of M-CSF that includes amino acids 65-73 or 138-144 of Figure 12 (corresponding to M-CSF epitopes recognized by 5H4 or MC3). In a related embodiment, all of the low risk residues are modified. Similarly, in another embodiment of the invention all of the low and moderate risk residues are modified. In yet another embodiment, all of the low and moderate risk residues excluding prolines are modified.

In another embodiment of the invention, a method of expressing an antibody having CDRs designed by the aforementioned process is provided. In another embodiment, a pharmaceutical composition comprising an antibody that binds MCSF wherein said antibody is made using the aforementioned method is provided.

In still another embodiment of the invention, a method of preventing or reducing bone loss is provided comprising administering to a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis a therapeutically effective amount of any one of the aforementioned antibodies, thereby preventing or reducing bone loss associated with the disease. In a related embodiment, a method of treating a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis is provided comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of the antibody of any one of the aforementioned antibodies, thereby reducing the severity of bone loss associated with the disease.

In a related embodiment, the aforementioned method is provided wherein said disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased osteoclast activity, including endocrinopathies (hypercortisolism, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidism), hypercalcemia, deficiency states (rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (malabsorption syndromes, chronic renal failure (renal osteodystrophy), chronic liver disease (hepatic osteodystrophy)), drugs (glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

In still another embodiment, a method of preventing or treating metastatic cancer to bone is provided comprising administering to a subject afflicted with metastatic cancer a therapeutically effective amount of any one of the aforementioned antibodies. In a related embodiment, the method is provided wherein the metastatic cancer is breast, lung,

renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia and lymphoma; head and neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, and cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; and skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

In yet another embodiment of the invention, a method of preventing bone loss and tumor growth is provded comprising administering to a subject in need thereof therapeutically effective amounts of any one of the aforementioned antibodies. In a related embodiment, the method further comprises administering a second therapeutic agent. In still another related embodiment, the method is provided wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent or a bisphosphonate. In yet another related embodiment, the method is provided wherein the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate. In yet another related embodiment, the aforementioned methods are provided wherein the therapeutic agent is a cytotoxic chemotherapeutic agent. In another embodiment, the aforementioned method is provided wherein the subject is precluded from receiving bisphosphonate treatment.

In still another related embodiment, the aforementioned method is provided wherein the antibody is effective to reduce the dosage of second therapeutic agent required to achieve a therapeutic effect. In another embodiment, the second therapeutic agent is a non-M-CSF colony stimulating factor, for example G-CSF, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor..

In another embodiment of the invention, the aforementioned methods are provided wherein the subject is a mammal. In a related embodiment, the mammal is human.

In another embodiment, the aforementioned methods are provided wherein the antibody inhibits the interaction between M-CSF and its receptor (M-CSFR). In another related embodiment, the antibody inhibits osteoclast proliferation and/or differentiation induced by tumor cells. In yet another embodiment, the aforementioned methods are provided wherein the antibody is administered at a dose between about 2 μg/kg to 30 mg/kg, 0.1 mg/kg to 30 mg/kg or 0.1 mg/kg to 10 mg/kg body weight.

In another embodiment of the invention, the use of an antibody of the

invention is contemplated in the manufacture of a medicament for preventing or reducing bone loss in a patient exhibiting symptoms of osteolysis, and in the manufacture of a medicament for treating a patient afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis. The aforementioned use is further contemplated wherein the disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased osteoclast activity, including endocrinopathies (including hypercortisolism, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidism), hypercalcemia, deficiency states (including rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (including malabsorption syndromes, chronic renal failure (including renal osteodystrophy), chronic liver disease (including hepatic osteodystrophy)), drugs (including glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (including osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

In another embodiment use of an antibody of the invention is contemplated in the manufacture of a medicament for preventing or treating metastatic cancer to bone in a patient suffering from metastatic cancer. In a related embodiment, the metastatic cancer is breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia or lymphoma; head or neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, or cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; or skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

In still another embodiment, use of an antibody of the invention is contemplated in the manufacture of a medicament for treating a patient having cancer.

In any of the aforementioned uses, the medicament is coordinated with treatment using a second therapeutic agent. In a related embodiment, the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent. In related embodiments, the second therapeutic agent is a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor, or a bisphosphonate. In a related embodiment, the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate.

In yet another embodiment of the invention, any of the aforementioned uses is contemplated wherein the patient is precluded from receiving bisphosphonate treatment, and/or wherein the patient has been pre-treated with the second therapeutic agent. In a related embodiment, the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent, a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor, or a bisphosphonate. In yet another related embodiment, the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate. In still another related embodiment, the patient is precluded from receiving bisphosphonate treatment.

In another embodiment of the invention, the use of a synergistic combination of an antibody of the invention for preparation of a medicament for treating a patient exhibiting symptoms of osteolysis wherein the medicament is coordinated with treatment using a second therapeutic agent is contemplated. In a related embodiment, the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent, a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor, or a bisphosphonate. In a related embodiment, the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate. In still another embodiment, the patient is precluded from receiving bisphosphonate treatment.

Embodiments of any of the aforementioned uses are contemplated wherein the amount of antibody in the medicament is at a dose effective to reduce the dosage of second therapeutic agent required to achieve a therapeutic effect. In any of the aforementioned embodiments relating to bone loss associated with cancer, the amount of antibody in the medicament is preferably effective to inhibit osteoclast proliferation and/or differentiation induced by tumor cells.

The amount of antibody in any of the aforementioned medicaments may be at a dose between about 2 μg/kg to 30 mg/kg body weight. In a related embodiment, the amount of antibody in the medicament is at a dose between about 0.1 mg/kg to 30 mg/kg body weight. In still another embodiment, the amount of antibody in the medicament is at a dose between about 0.1 mg/kg to 10 mg/kg body weight.

Kits are also contemplated by the present invention. In one embodiment, a kit comprising a therapeutically effective amount of an antibody of the invention, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications

and/or instructions regarding use of the contents of the container to prevent or reduce bone loss is provided.

In another embodiment, a kit comprising a therapeutically effective amount of an antibody of the invention, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to a patient afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis is provided.

In a related embodiment, the kit is provided wherein said disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased osteoclast activity, including endocrinopathies (including hypercortisolism, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidiam), hypercalcemia, deficiency states (including rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (including malabsorption syndromes, chronic renal failure (including renal osteodystrophy), chronic liver disease (including hepatic osteodystrophy)), drugs (including glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (including osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

In another embodiment, a kit is provided comprising a therapeutically effective amount of an antibody of the invention, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to prevent or treat metastatic cancer to bone. In a related embodiment, the metastatic cancer is breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia or lymphoma; head or neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, or cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; or skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

In yet another embodiment, a kit is provided comprising a therapeutically effective amount of an antibody of the invention, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to treat cancer.

In another embodiment, the kit further comprises a second therapeutic agent. In a related embodiment, the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent, a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor, or a bisphosphonate. In a related embodiment, the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate. In yet another embodiment, the kit inludes instructions to treat a patient precluded from receiving bisphosphonate treatment.

In another embodiment, the aforementioned kit is provided comprising a dose of antibody effective to reduce the dosage of second therapeutic agent required to achieve a therapeutic effect. In another embodiment, the kit comprises a synergistic dose of antibody. In yet another embodiment, the kit comprises a dose of antibody effective to inhibit osteoclast proliferation and/or differentiation induced by tumor cells.

In still another embodiment of the invention, the aforementioned kit comprises a dose of antibody between about 2 μg/kg to 30 mg/kg body weight. In another embodiment, the kit comprises a dose of antibody between about 0.1 mg/kg to 30 mg/kg body weight. In still another embodiment, the kit comprises a dose of antibody between about 0.1 mg/kg to 10 mg/kg body weight.

In still another embodiment of the invention, a package, vial or container is provided comprising a medicament comprising one or more of the aforementioned antibodies and instructions that the medicament should be used in combination with surgery or radiation therapy. In another embodiment, a method of preventing or treating metastatic cancer to bone comprising the steps of administering any one of the aforementioned antibodies to a subject and treating the subject with surgery or radiation therapy is provided. In another embodiment, a method of targeting a tumor cell expressing membrane-bound M-CSF on its surface is provided comprising the step of administering any one of the aforementioned antibodies, wherein the antibody is conjugated to a radionuclide or other toxin. In yet another embodiment, a method of treating a subject suffering from a cancer is provided comprising

administering a therapeutically effective amount of the any one of the aforementioned antibodies.

In still another embodiment of the invention, a method of preventing bone loss is provided comprising administering to a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis an amount of any one of the aforementioned antibodies in an amount effective to neutralize M-CSF produced by the subject's cells, the amount being larger than the amount effective to neutralize M-CSF produced by the cancer cells. In a related embodiment, a method of treating a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis is provided comprising administering to said subject an amount of any one of the aforementioned antibodies in an amount effective to neutralize M-CSF produced by the subject's cells, the amount being larger than the amount effective to neutralize M-CSF produced by the cancer cells.

In one embodiment of the invention, a pharmaceutical composition is provided comprising antibody RX1, 5H4, MC1 and/or MC3, or a non-murine RX1, 5H4, MC1 and/or MC3 derived antibody or an RX1, 5H4, MC1 and/or MC3 competing antibody, and a cancer therapeutic agent. In another embodiment of the invention, a package, vial or container is provided comprising a medicament comprising antibody RX1, 5H4, MC1 and/or MC3, or a non-murine RX1, 5H4, MC1 and/or MC3 derived antibody or an RX1, 5H4, MC1 and/or MC3 competing antibody, and instructions that the medicament should be used in combination with surgery or radiation therapy.

In still another embodiment of the invention, a method of treating a subject suffering from a cancer is provided, wherein the cells comprising the cancer do not secrete M-CSF, comprising the step of administering any one of the aforementioned antibodies.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a topology diagram showing the disulfide bonds in truncated dimeric M-CSF.

Figure 2 is a stereodiagram of the C-alpha backbone of M-CSF with every tenth residue labeled and with the non-crystallographic symmetry axis indicated by a dotted line.

Figure 3 is a comparison of osteoclast inducing activity between purified M-

CSF and conditioned medium (CM) from MDA 231 cells and MCF7 cells.

Figure 4A shows the amino acid sequence of M-CSF-specific murine antibody RX1 (SEQ ID NOs: 2 and 4) (encoded by the cDNA insert of the plasmid deposited with the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, under ATCC deposit number PTA-6113) and a corresponding nucleic acid sequence (SEQ ID NOs: 1 and 3). The CDR regions are numbered and shown in bold.

Figures 4B and 4C show the amino acid sequences of M-CSF specific murine antibody RX1 light (SEQ ID NO: 5) and heavy chains (SEQ ID NO: 6), respectively, with high risk (bold), moderate risk (underline), and low risk residues identified according to Studnicka et al., WO93/11794.

Figure 5A shows that M-CSF antibodies RX1 and 5A1 are species specific. Figure 5B shows the M-CSF neutralization activity of antibodies MC1 and MC3.

Figure 6 shows that antibody RX1 effectively inhibits osteolysis in a human xenograft model at a concentration 5mg/kg.

Figure 7 shows that the number of metastases is reduced when antibody RX1 is administered to human breast cancer MDA-MB-231 bearing nude mice at a concentration of 5 mg/kg.

Figure 8A and 8B shows that an M-CSF-specific antibody bound to breast cancer cell line MDA-MB-231 or to multiple myeloma cancer cell line ARH77.

Figure 9 shows that M-CSF is prevalent on a number of cancer cell surfaces.

Figure 10 is the amino acid sequence of M-CSFα (SEQ ID NO: 7).

Figure 11 is the amino acid sequence of M-CSFβ (SEQ ID NO: 8).

Figure 12 is the amino acid sequence of M-CSFγ (SEQ ID NO: 9). A number of polymorphisms in the DNA sequence may result in amino acid differences. For example, a common polymorphism provides an Ala rather than Pro at position 104.

Figures 13, 14, and 15 show the amino acid sequences of MCSF-specific murine antibodies 5H4 (SEQ ID NOs: 10 and 11), MC1 (SEQ ID NOs: 12 and 13) (produced by the hybridoma deposited under ATCC deposit number PTA-6263) and MC3 (SEQ ID NOs: 14 and 15) (produced by the hybridoma deposited under ATCC deposit number PTA-6264), respectively.

Figures 16A and B are an alignment of CDR regions of the heavy and light chain amino acid sequences of human M-CSF specific murine antibodies RX1; 5H4; MC1; and MC3 (SEQ ID NOs: 16-38).

Figure 17 shows the neutralization activities of intact versus Fab fragments for RX1 versus 5H4.

Figure 18 shows the structure of M-CSF with RX1, 5H4, and MC3 epitopes highlighted (SEQ ID NOs: 120, 122, and 123).

Figure 19A shows (a) the risk line for the murine RX1 heavy chain (H=high risk, M=moderate risk, L=low risk), (b) the RX1 heavy chain amino acid sequence (SEQ ID NO: 6), (c) the amino acid sequence of the closest human consensus sequence, Kabat Vh2 consensus, aligned to RX1 (SEQ ID NO: 39) and (d) changes that were made to produce two exemplary Human Engineered™ sequences (SEQ ID NOs: 41 and 43). Figure 19B shows the amino acid sequences of the two exemplary heavy chain Human Engineered™ sequences (SEQ ID NOs: 41 and 43), designated "low risk" and "low+moderate risk" as well as corresponding nucleic acid sequences (SEQ ID NOs: 40 and 42).

Figure 20A shows (a) the risk line for the murine RX1 light chain (H=high risk, M=moderate risk, L=low risk), (b) the RX1 light chain amino acid sequence (SEQ ID NO: 5), (c) the amino acid sequence of the closest human consensus sequence, Kabat Vk3 consensus, aligned to RX1 (SEQ ID NO: 49) and (d) changes that were made to produce two exemplary Human Engineered™ sequences (SEQ ID NOs: 45 and 47). Figure 20B shows the amino acid sequences of the two exemplary light chain Human Engineered™ sequences (SEQ ID NOs: 45 and 47), designated "low risk" and "low+moderate risk" as well as corresponding nucleic acid sequences (SEQ ID NOs: 44 and 46).

Figure 21A shows (a) the risk line for the murine RX1 light chain (H=high risk, M=moderate risk, L=low risk), (b) the RX1 light chain amino acid sequence (SEQ ID NO: 5), (c) the amino acid sequence of the closest human consensus sequence, Kabat Vk3 consensus, aligned to RX1 (SEQ ID NO: 49) and (d) an alternate exemplary amino acid sequence in which positions 54-56 were not changed (i.e. remained the murine sequence) (SEQ ID NO: 48). Figure 21B shows the amino acid sequences of two exemplary alternate light chain Human Engineered™ sequences (SEQ ID NOs: 48, 136), as well as corresponding nucleic acid sequences (SEQ ID NOs: 137 and 135).

Figure 22A shows (a) the risk line for the murine RX1 light chain (H=high

risk, M=moderate risk, L=low risk), (b) the RX1 light chain amino acid sequence (SEQ ID NO: 5), (c) the amino acid sequence of the closest human consensus germline sequence, Vk6 Subgroup 2-1-(1) A14, aligned to RX1 (SEQ ID NO: 50)and (d) changes that were made to produce two exemplary Human Engineered™ sequences (SEQ ID NOs: 51 and 53). Figure 22B shows the amino acid sequences of the two exemplary light chain Human Engineered™ sequences (SEQ ID NOs: 51 and 53), designated "low risk" and "low+moderate risk" as well as the corresponding nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 52).

Figures 23A and 23B show the alignment of murine RX1 light chain amino acid sequence (SEQ ID NO: 54) with various human consensus and human germline consensus sequences using the Kabat numbering system (amino acid numbering indicated in line designated "POS") (SEQ ID NOs: 55-82).

Figures 24A and 24B show the alignment of murine RX1 heavy chain amino acid sequence (SEQ ID NO: 83) with various human consensus and human germline consensus sequences using the Kabat numbering system (amino acid numbering indicated in line designated "POS") (SEQ ID NOs: 84-112). Figures 24C-24E show how the amino acid residues of antibodies 5H4, MC1 and MC3 correspond to the Kabat numbering system (SEQ ID NOs: 10 and 11; SEQ ID NOs: 12 and 13; SEQ ID NOs: 14 and 15, respectively).

Figure 25 shows the comparative neutralization of recombinant human MCSF by recombinant murine RX1 antibody, labeled as rmRX1, and three versions of Human Engineered™ RX1-1 antibody (in which all of the low risk changes have been made) that each have a different constant region (IgG1, IgG2 or IgG4), labeled as heRX1-1.G1, heRX1-1.G2, and heRX1-1.G4.

Figure 26 shows the comparative neutralization of human serum by recombinant murine RX1 antibody, labeled as rmRX1 and several different versions of heRX1-1 (in which all of the low risk changes have been made) that each have a different constant region (IgG1, IgG2 or IgG4), labeled as RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4.

Figure 27 shows the comparative neutralization of MDA231 (breast cancer cell line) medium by recombinant murine RX1 antibody, rmRX1, and several different versions of heRX1-1 (in which all of the low risk changes have been made) that each have a different constant region (IgG1, IgG2 or IgG4), labeled as RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4.

Figure 28 shows the effect on osteoclastogenesis (as measured by TRAP activity) of recombinant murine RX1 antibody, rmRX1, and two different versions heRX1-1 that each have a different constant region (Ig1 or IgG2), labeled heRX1-1.IgG1 and heRX1-1.IgG2.

Figure 29A shows the amino acid (SEQ ID NO: 114) and nucleotide sequence (SEQ ID NO: 113) for heRX1-1.IgG1 with low risk amino acid changes. Figure 29B shows the amino acid (SEQ ID NO: 116) and nucleotide sequence (SEQ ID NO: 115) for heRX1-1.IgG1 with low + moderate risk amino acid changes.

Figure 30 shows the amino acid (SEQ ID NO: 119) and nucleotide sequence (cDNA (SEQ ID NO: 118) and genomic DNA (SEQ ID NO: 117)) for heRX1-1.IgG4 with low risk amino acid changes.

DETAILED DESCRIPTION

The ability to metastasize is a defining characteristic of a cancer. Metastasis refers to the spread of cancer cells to other parts of the body or to the condition produced by this spread. Metastasis is a complex multi-step process that includes changes in the genetic material of a cell, uncontrolled proliferation of the altered cell to form a primary tumor, development of a new blood supply for the primary tumor, invasion of the circulatory system by cells from the primary tumor, dispersal of small clumps of primary tumor cells to other parts of the body, and the growth of secondary tumors in those sites.

Bone is one of the most common sites of metastasis in human breast, lung, prostate and thyroid cancers, as well as other cancers, and in autopsies as many as 60% of cancer patients are found to have bone metastasis. Osteolytic bone metastasis shows a unique step of osteoclastic bone resorption that is not seen in metastasis to other organs. Bone loss associated with cancer metastasis is mediated by osteoclasts (multinucleated giant cells with the capacity to resorb mineralized tissues), which seem to be activated by tumor products.

Colony stimulating factor (CSF-1), also known as macrophage colony stimulating factor (M-CSF), has been found crucial for osteoclast formation. In addition, M-CSF has been shown to modulate the osteoclastic functions of mature osteoclasts, their migration and their survival in cooperation with other soluble factors and cell to cell interactions provided by osteoblasts and fibroblasts (Fixe and Praloran, Cytokine 10: 3-7, 1998; Martin et al., Critical Rev. in Eukaryotic Gene Expression 8: 107-23 (1998)).

The full-length human M-CSF mRNA encodes a precursor protein of 554 amino acids. Through alternative mRNA splicing and differential post-translational proteolytic processing, M-CSF can either be secreted into the circulation as a glycoprotein or chondroitin sulfate containing proteoglycan or be expressed as a membrane spanning glycoprotein on the surface of M-CSF producing cells. The three-dimensional structure of the bacterially expressed amino terminal 150 amino acids of human M-CSF, the minimal sequence required for full in vitro biological activity, indicates that this protein is a disulfide linked dimer with each monomer consisting of four alpha helical bundles and an anti-parallel beta sheet (Pandit et al., Science 258: 1358-62 (1992)). Three distinct M-CSF species are produced through alternative mRNA splicing. The three polypeptide precursors are M-CFSα of 256 amino acids, M-CSFβ of 554 amino acids, and M-CSFγ of 438 amino acids. M-CSFβ is a secreted protein that does not occur in a membrane-bound form. M-CSFα is expressed as an integral membrane protein that is slowly released by proteolytic cleavage. M-CSFα is cleaved at amino acids 191-197 of the sequence set out in Figure 10. The membrane-bound form of M-CSF can interact with receptors on nearby cells and therefore mediates specific cell-to-cell contacts. The term "M-CSF" may also inlcude amino acids 36-438 of Figure 12.

Various forms of M-CSF function by binding to its receptor M-CSFR on target cells. M-CSFR is a membrane spanning molecule with five extracellular immunoglobulin-like domains, a transmembrane domain and an intracellular interrupted Src related tyrosine kinase domain. M-CSFR is encoded by the *c-fms* proto-oncogene. Binding of M-CSF to the extracellular domain of M-CSFR leads to dimerization of the receptor, which activates the cytoplasmic kinase domain, leading to autophosphorylation and phosphorylation of other cellular proteins (Hamilton J. A., J Leukoc Biol.,62(2):145-55 (1997); Hamilton J, A., Immuno Today., 18(7): 313-7(1997).

Phosphorylated cellular proteins induce a cascade of biochemical events leading to cellular responses: mitosis, secretion of cytokines, membrane ruffling, and regulation of transcription of its own receptor (Fixe and Praloran, Cytokine 10: 32-37 (1998)).

M-CSF is expressed in stromal cells, osteoblasts, and other cells. It is also expressed in breast, uterine, and ovarian tumor cells. The extent of expression in these tumors correlates with high grade and poor prognosis (Kacinski Ann. Med. 27: 79-85 (1995); Smith et al., Clin. Cancer Res. 1: 313-25 (1995)). In breast carcinomas, M-CSF expression is prevalent in invasive tumor cells as opposed to the intraductal (pre-invasive) cancer (Scholl et

al., J. Natl. Cancer Inst. 86: 120-6 (1994)). In addition, M-CSF is shown to promote progression of mammary tumors to malignancy (Lin et al., J. Exp. Med. 93: 727-39 (2001)). For breast and ovarian cancer, the production of M-CSF seems to be responsible for the recruitment of macrophages to the tumor.

As shown herein, an M-CSF-specific antibody such as RX1, 5H4, MC1 or MC3 antibody, neutralizes osteoclast induction by metastatic cancer cells and/or reduces metastases to bone in animal models of cancer. Thus, the present invention provides compositions and methods for treating or preventing cancer, cancer metastasis and bone loss associated with cancer metastasis.

A preferred anti-M-CSF antibody murine RX1 was modified to be less immunogenic in humans based on the Human Engineering™ method of Studnicka et al. In a preferred embodiment, 8 to 12 surface exposed amino acid residues of the heavy chain variable region and 16 to 19 surface exposed residues in the light chain region were modified to human residues in positions determined to be unlikely to adversely effect either antigen binding or protein folding, while reducing its immunogenicity with respect to a human environment. Synthetic genes containing modified heavy and/or light chain variable regions were constructed and linked to human γ heavy chain and/or kappa light chain constant regions. Any human heavy chain and light chain constant regions may be used in combination with the Human Engineered™ antibody variable regions. The human heavy and light chain genes were introduced into mammalian cells and the resultant recombinant immunoglobulin products were obtained and characterized. Other exemplary anti-M-CSF antibodies such as 5H4, MC1, or MC3 are similarly Human Engineered™.

The term "RX 1-derived antibody" includes any one of the following:

1) an amino acid variant of murine antibody RX1 having the amino acid sequence set out in Figure 4, including variants comprising a variable heavy chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% homologous to the amino acid sequence as set forth in Figure 4, and/or comprising a variable light chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% homologous to the amino acid sequence as set forth in Figure 4, taking into account similar amino acids for the homology determination;

2) M-CSF-binding polypeptides (excluding murine antibody RX 1) comprising one or more complementary determining regions (CDRs) of murine antibody RX

1 having the amino acid sequence set out in Figure 4, preferably comprising at least CDR3 of the RX 1 heavy chain, and preferably comprising two or more, or three or more, or four or more, or five or more, or all six CDRs;

3) Human Engineered™ antibodies having the heavy and light chain amino acid sequences set out in Figures 19B through 22B or variants thereof comprising a heavy or light chain having at least 60% amino acid sequence identity with the original Human Engineered™ heavy or the light chain of Figures 19B through 22B, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95%, including for example, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, and 100% identical;

4) M-CSF-binding polypeptides (excluding murine antibody RX1) comprising the high risk residues of one or more CDRs of the Human Engineered™ antibodies of Figures 19B through 22B, and preferably comprising high risk residues of two or more, or three or more, or four or more, or five or more, or all six CDRs;

5) Human Engineered™ antibodies or variants retaining the high risk amino acid residues set out in Figure 4B, and comprising one or more changes at the low or moderate risk residues set out in Figure 4B;

for example, comprising one or more changes at a low risk residue and conservative substitutions at a moderate risk residue set out in Figure 4B, or

for example, retaining the moderate and high risk amino acid residues set out in Figure 4B and comprising one or more changes at a low risk residue,

where changes include insertions, deletions or substitutions and may be conservative substitutions or may cause the engineered antibody to be closer in sequence to a human light chain or heavy chain sequence, a human germline light chain or heavy chain sequence, a consensus human light chain or heavy chain sequence, or a consensus human germline light chain or heavy chain sequence;

that retain ability to bind M-CSF. Such antibodies preferably bind to M-CSF with an affinity of at least 10^{-7}, 10^{-8} or 10^{-9} or higher and preferably neutralize the osteoclastogenesis inducing activity of M-CSF.

Similarly, the term "MC3-derived antibody" includes any one of the

18

following:

1) an amino acid variant of murine antibody MC3 having the amino acid sequence set out in Figure 15, including variants comprising a variable heavy chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% homologous to the amino acid sequence as set forth in Figure 15, and/or comprising a variable light chain amino acid sequence which is at least 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, or 99% homologous to the amino acid sequence as set forth in Figure 15, taking into account similar amino acids for the homology determination;

2) M-CSF-binding polypeptides (optionally including or excluding murine antibody MC3) comprising one or more complementary determining regions (CDRs) of murine antibody MC3 having the amino acid sequence set out in Figure 15, preferably comprising at least CDR3 of the MC3 heavy chain, and preferably comprising two or more, or three or more, or four or more, or five or more, or all six CDRs;

3) Human Engineered™ antibodies generated by altering the murine sequence according to the methods set forth in Studnicka et al., U.S. Patent No. 5,766,886 and Example 4A herein, using the Kabat numbering set forth in figures 24C-24E to identify low, moderate and high risk residues; such antibodies comprising at least one of the following heavy chains and at least one of the following light chains: (a) a heavy chain in which all of the low risk residues have been modified, if necessary, to be the same residues as a human reference immunoglobulin sequence or (b) a heavy chain in which all of the low and moderate risk residues have been modified, if necessary, to be the same residues as a human reference immunoglobulin sequence, (c) a light chain in which all of the low risk residues have been modified, if necessary, to be the same residues as a human reference immunoglobulin sequence or (b) a light chain in which all of the low and moderate risk residues have been modified, if necessary, to be the same residues as a human reference immunoglobulin sequence

4) variants of the aforementioned antibodies in preceding paragraph (3) comprising a heavy or light chain having at least 60% amino acid sequence identity with the original Human Engineered™ heavy or the light chain, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95%, including for example, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, and 100% identical;

5) M-CSF-binding polypeptides (optionally including or excluding murine antibody MC3) comprising the high risk residues of one or more CDRs of the murine MC3 antibody of Figure 15, and preferably comprising high risk residues of two or more, or three or more, or four or more, or five or more, or all six CDRs;

6) Human Engineered™ antibodies or variants retaining the high risk amino acid residues of murine MC3 antibody, and comprising one or more changes at the low or moderate risk residues;

for example, comprising one or more changes at a low risk residue and conservative substitutions at a moderate risk residue, or

for example, retaining the moderate and high risk amino acid residues and comprising one or more changes at a low risk residue,

where changes include insertions, deletions or substitutions and may be conservative substitutions or may cause the engineered antibody to be closer in sequence to a human light chain or heavy chain sequence, a human germline light chain or heavy chain sequence, a consensus human light chain or heavy chain sequence, or a consensus human germline light chain or heavy chain sequence;

that retain ability to bind M-CSF. Such antibodies preferably bind to M-CSF with an affinity of at least 10^{-7}, 10^{-8} or 10^{-9} or higher and preferably neutralize the osteoclastogenesis inducing activity of M-CSF.

The term "5H4-derived antibody" or "MC1-derived antibody" is similarly defined according to the above description.

As described in detail herein, RX1, 5H4, MC1 or MC3-derived antibodies, including Human Engineered™ antibodies or variants, may be of different isotypes, such as IgG, IgA, IgM or IgE. Antibodies of the IgG class may include a different constant region, e.g. an IgG2 antibody may be modified to display an IgG1 or IgG4 constant region. In preferred embodiments, the invention provides Human Engineered™ antibodies or variants comprising a modified or unmodified IgG1 or IgG4 constant region. In the case of IgG1, modifications to the constant region, particularly the hinge or CH2 region, may increase or decrease effector function, including ADCC and/or CDC activity. In other embodiments, an IgG2 constant region is modified to decrease antibody-antigen aggregate formation. In the case of IgG4, modifications to the constant region, particularly the hinge region, may reduce the formation of half-antibodies. In specific exemplary embodiments, mutating the IgG4

hinge sequence Cys-Pro-Ser-Cys to the IgG1 hinge sequence Cys-Pro-Pro-Cys is provided.

Human Engineered™ antibodies containing IgG1 or IgG4 constant regions are shown herein to have improved properties compared to Human Engineered™ antibodies containing IgG2 constant regions. Choice of the IgG1 or IgG4 Fc region improved binding affinity, MCSF neutralization activity, and anti-osteoclast activity. In addition, choice of the IgG1 or IgG4 Fc region provided antigen-antibody complexes that more closely resembled those formed by the parent murine antibody.

The mobility at the hinge region thus appears to markedly affect binding of antibody to the dimeric antigen MCSF as well as neutralization activity of the antibody. The invention contemplates generally that preparation of antibodies containing a heavy chain comprising a modified or unmodified IgG1 or IgG4 constant region, particularly the hinge and CH2 domains, or preferably at least the hinge domains, improves binding affinity and/or slows dissociation of antibody from dimeric antigens.

The term "RX1-competing antibody" includes

1) a non-murine or non-rodent monoclonal antibody that binds to the same epitope of M-CSF as murine RX1 having the complete light and heavy chain sequences set out in Figure 4;

2) a non-murine or non-rodent monoclonal antibody that binds to at least 4 contiguous amino acids of amino acids 98-105 of the M-CSF of Figure12; and

3) a non-murine or non-rodent monoclonal antibody that competes with murine antibody RX1 having the complete sequence set out in Figure 4 for binding to M-CSF, by more than 75%, more than 80%, or more than 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% or 95%. Such antibodies preferably bind to M-CSF with an affinity of at least 10^{-7}, 10^{-8} or 10^{-9} or higher and preferably neutralize the osteoclastogenesis inducing activity of M-CSF.

The term "MC1-competing antibody" or "MC3-competing antibody" or "5H4-competing antibody" is similarly defined with reference to the murine 5H4, MC1 or MC3 antibodies having the complete light and heavy chain sequences set out in Figure 13, 14 or 15, respectively, and with reference to the epitope of M-CSF bound by the antibody, e.g. amino acids 65-73 or 138-144 of Figure 12 (corresponding to M-CSF epitopes recognized by 5H4 or MC3).

Optionally, any chimeric, human or humanized M-CSF antibody publicly disclosed before the filing date hereof, or disclosed in an application filed before the filing date hereof, is excluded from the scope of the invention.

"Non-rodent" monoclonal antibody is any antibody, as broadly defined herein, that is not a complete intact rodent monoclonal antibody generated by a rodent hybridoma. Thus, non-rodent antibodies specifically include, but are not limited to, variants of rodent antibodies, rodent antibody fragments, linear antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, Human Engineered™ antibodies and human antibodies, including human antibodies produced from transgenic animals or via phage display technology. Similarly, non-murine antibodies include but are not limited to variants of murine antibodies, murine antibody fragments, linear antibodies, chimeric, humanized, Human Engineered™ and human antibodies.

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include but are not limited to, carcinoma,; lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia. More particular examples of such cancers include breast cancer, prostate cancer, colon cancer, squamous cell cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, colorectal cancer, endometrial carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, liver cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma and various types of head and neck cancer.

"Treatment" is an intervention performed with the intention of preventing the development or altering the pathology of a disorder. Accordingly, "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those in which the disorder is to be prevented. In tumor (e.g., cancer) treatment, a therapeutic agent may directly decrease the pathology of tumor cells, or render the tumor cells more susceptible to treatment by other therapeutic agents, e.g., radiation and/or chemotherapy. Treatment of patients suffering from clinical, biochemical, radiological or subjective symptoms of the disease, such as osteolysis, may include alleviating some or all of such symptoms or reducing the predisposition to the

disease. The "pathology" of cancer includes all phenomena that compromise the well being of the patient. This includes, without limitation, abnormal or uncontrollable cell growth, metastasis, interference with the normal functioning of neighboring cells, release of cytokines or other secretory products at abnormal levels, suppression or aggravation of inflammatory or immunological response, etc. Thus, improvement after treatment may be manifested as decreased tumor size, decline in tumor growth rate, destruction of existing tumor cells or metastatic cells, and/or a reduction in the size or number of metastases.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, cows, etc. Preferably, the mammal is human.

As used herein, the phrase "metastatic cancer" is defined as cancers that have potential to spread to other areas of the body, particularly bone. A variety of cancers can metastasize to the bone, but the most common metastasizing cancers are breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid and prostate. By way of example, other cancers that have the potential to metastasize to bone include but are not limited to adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia and lymphoma; head and neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, and cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; and skin cancer, including malignant melanoma and squamous cell cancer. The present invention especially contemplates prevention and treatment of tumor-induced osteolytic lesions in bone.

As used herein, the phrase "therapeutically effective amount" refers to is meant to refer to an amount of therapeutic or prophylactic M-CSF antibody that would be appropriate for an embodiment of the present invention, that will elicit the desired therapeutic or prophylactic effect or response when administered in accordance with the desired treatment regimen.

Human "M-CSF" as used herein refers to a human polypeptide having substantially the same amino acid sequence as the mature human M-CSFα, M-CSFβ, or M-CSFγ polypeptides described in Kawasaki et al., Science 230:291 (1985), Cerretti et al., Molecular Immunology, 25:761 (1988), or Ladner et al., EMBO Journal 6:2693 (1987), each

of which are incorporated herein by reference. Such terminology reflects the understanding that the three mature M-CSFs have different amino acid sequences, as described above, and that the active form of M-CSF is a disulfide bonded dimer; thus, when the term "M-CSF" refers to the biologically active form, the dimeric form is intended. "M-CSF dimer" refers to two M-CSF polypeptide monomers that have dimerized and includes both homodimers (consisting of two of the same type of M-CSF monomer) and heterodimers (consisting of two different monomers). M-CSF monomers may be converted to M-CSF dimers in vitro as described in U.S. Pat. No. 4,929,700, which is incorporated herein by reference.

Anti-MCSF antibodies

The present invention provides a M-CSF-specific antibody, such as RX1, 5H4, MC1, and/or MC3, pharmaceutical formulations including a M-CSF-specific antibody, such as RX1, 5H4, MC1, and/or MC3, methods of preparing the pharmaceutical formulations, and methods of treating patients with the pharmaceutical formulations and compounds. The term "antibody" is used in the broadest sense and includes fully assembled antibodies, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies), antibody fragments that can bind antigen (e.g., Fab', F'(ab)2, Fv, single chain antibodies, diabodies), and recombinant peptides comprising the forgoing as long as they exhibit the desired biological activity.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations that are typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are synthesized by the homogeneous culture, uncontaminated by other immunoglobulins with different specificities and characteristics.

The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by

the hybridoma method first described by Kohler et al., Nature, 256:495 [19751, or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described inClackson et al.,Nature,352:624628[1991] end Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), for example.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes, IgA, IgD, IgE, IgG and IgM, and several of these may be further divided into subclasses or isotypes, e.g. lgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma and mu respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known. Different isotypes have different effector functions; for example, IgG1 and IgG3 isotypes have ADCC activity.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact full length antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')2, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata et al., Protein Eng.,8(10):1057-1062 (1995)); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments. Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize 35 readily. Pepsin treatment yields an F(ab')2 fragment that has two "Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains that enables the Fv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv see Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 1 13, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "hypervariable" region refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region comprises amino acid residues from a complementarity determining region or CDR [i.e., residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain as described by Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National

Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] and/or those residues from a hypervariable loop (*i.e.*, residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain as described by [Chothia et al., *J. Mol.Biol. 196*: 901-917 (1987)].

"Framework" or FR residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues.

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) in the same polypeptide chain (VH VL). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and 30 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

In some embodiments, it may be desirable to generate multispecific (e.g. bispecific) monoclonal antibody including monoclonal, human, humanized, Human Engineered™ or variant anti-M-CSF antibodies having binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of M-CSF. Alternatively, an anti-M-CSF arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g., CD2 or CD3), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the M-CSF-expressing cell. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express M-CSF. These antibodies possess an M-CSF-binding arm and an arm which binds the cytotoxic agent (e.g., saporin, anti-interferon-60, vinca alkaloid, ricin A chain, methotrexate or radioactive isotope hapten). Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g., F(ab').sub.2 bispecific antibodies).

According to another approach for making bispecific antibodies, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g., tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of

22

identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g., alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers. See WO96/27011 published Sep. 6, 1996.

Bispecific antibodies include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin. Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Pat. No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan et al., Science 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes. In yet a further embodiment, Fab'-SH fragments directly recovered from E. coli can be chemically coupled in vitro to form bispecific antibodies. (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992))

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E.coli* and subjected to directed chemical coupling in vitro to form the bispecfic antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the HER2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. (Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)) The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were

linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments.

The fragments comprise a heavy chain variable region (V_H) connected to a light-chain variable region (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. *See* Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Alternatively, the bispecific antibody may be a "linear antibody" produced as described in Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995). Briefly, these antibodies comprise a pair of tandem Fd segments (V_H -C_H1-V_H -C_H1) which form a pair of antigen binding regions. Linear antibodies can be bispecific or monospecific.

Antibodies with more than two valencies are also contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. (Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991))

In certain embodiments, the monoclonal, human, humanized, Human Engineered™ or variant anti-M-CSF antibody is an antibody fragment, such as an RX1, 5H4, MC1, or MC3 antibody fragment. Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, e.g., Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) disclose secretion of functional antibody fragments from bacteria (*see, e.g.*, Better et al., Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988)). For example, Fab'-SH fragments can be directly recovered from E. coli and chemically coupled to form $F(ab')_2$ fragments (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). In another embodiment, the $F(ab')_2$ is formed using the leucine zipper GCN4 to promote assembly of the $F(ab')_2$ molecule. According to another approach, Fv, Fab or $F(ab')_2$ fragments can be

73

isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner.

An "isolated" antibody is one that has been identified and separated and for recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials that would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody in situ within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

For a detailed description of the structure and generation of antibodies, see Roth, D.B., and Craig, N.L., *Cell*, 94:411-414 (1998), and United States Patent No. 6,255,458, herein incorporated by reference in its entirety. Briefly, the process for generating DNA encoding the heavy and light chain immunoglobulin genes occurs primarily in developing B-cells. Prior to the rearranging and joining of various immunoglobulin gene segments, the V, D, J and constant (C) gene segments are found generally in relatively close proximity on a single chromosome. During B-cell-differentiation, one of each of the appropriate family members of the V, D, J (or only V and J in the case of light chain genes) gene segments are recombined to form functionally rearranged heavy and light immunoglobulin genes. This gene segment rearrangement process appears to be sequential. First, heavy chain D-to-J joints are made, followed by heavy chain V-to-DJ joints and light chain V-to-J joints.

The recombination of variable region gene segments to form functional heavy and light chain variable regions is mediated by recombination signal sequences (RSS's) that flank recombinationally competent V, D and J segments. RSS's necessary and sufficient to direct recombination, comprise a dyad-symmetric heptamer, an AT-rich nonamer and an intervening spacer region of either 12 or 23 base pairs. These signals are conserved among the different loci and species that carry out D-J (or V-J) recombination and are functionally interchangeable. See Oettinger, et al. (1990), Science, 248, 1517-1523 and references cited

therein. The heptamer comprises the sequence CACAGTG or its analogue followed by a spacer of unconserved sequence and then a nonamer having the sequence ACAAAAACC or its analogue. These sequences are found on the J, or downstream side, of each V and D gene segment. Immediately preceding the germline D and J segments are again two recombination signal sequences, first the nonamer and then the heptamer again separated by an unconserved sequence. The heptameric and nonameric sequences following a V_L, V_H or D segment are complementary to those preceding the J_L, D or J_H segments with which they recombine. The spacers between the heptameric and nonameric sequences are either 12 base pairs long or between 22 and 24 base pairs long.

In addition to the rearrangement of V, D and J segments, further diversity is generated in the primary repertoire of immunoglobulin heavy and light chain by way of variable recombination at the locations where the V and J segments in the light chain are joined and where the D and J segments of the heavy chain are joined. Such variation in the light chain typically occurs within the last codon of the V gene segment and the first codon of the J segment. Similar imprecision in joining occurs on the heavy chain chromosome between the D and J_H segments and may extend over as many as 10 nucleotides. Furthermore, several nucleotides may be inserted between the D and J_H and between the V_H and D gene segments which are not encoded by genomic DNA. The addition of these nucleotides is known as N-region diversity.

The net effect of such rearrangements in the variable region gene segments and the variable recombination which may occur during such joining is the production of a primary antibody repertoire.

"Fv" is the minimum antibody fragment that contains a complete antigen recognition and binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen binding site on the surface of the VH VI dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab fragments differ from Fab' fragments by

24

the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')2 antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them.

By "neutralizing antibody" is meant an antibody molecule that is able to eliminate or significantly reduce an effecter function of a target antigen to which is binds. Accordingly, a "neutralizing" anti-target antibody is capable of eliminating or significantly reducing an effecter function, such as enzyme activity, ligand binding, or intracellular signaling.

As provided herein, the compositions for and methods of treating cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis may utilize one or more antibody used singularly or in combination with other therapeutics to achieve the desired effects. Antibodies according to the present invention may be isolated from an animal producing the antibody as a result of either direct contact with an environmental antigen or immunization with the antigen. Alternatively, antibodies may be produced by recombinant DNA methodology using one of the antibody expression systems well known in the art (See, e.g., Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Such antibodies may include recombinant IgGs, chimeric fusion proteins having immunoglobulin derived sequences or "Human Engineered™" antibodies that may all be used for the treatment of cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis according to the present invention. In addition to intact, full-length molecules, the term "antibody" also refers to fragments thereof (such as, e.g., scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' and F(ab)'2 fragments) or multimers or aggregates of intact molecules and/or fragments that bind to M-CSF (or M-CSFR). These antibody fragments bind antigen and may be derivatized to exhibit structural features that facilitate clearance and uptake, e.g., by incorporation of galactose residues.

In one embodiment of the present invention, M-CSF monoclonal antibodies may be prepared essentially as described in Halenbeck et al. U.S. Pat. No. 5,491,065 (1997), incorporated herein by reference. Exemplary M-CSF monoclonal antibodies include those that bind to an apparent conformational epitope associated with recombinant or native dimeric M-CSF with concomitant neutralization of biological activity. These antibodies are substantially unreactive with biologically inactive forms of M-CSF including monomeric and

chemically derivatized dimeric M-CSF.

In other embodiments of the present invention, Human Engineered™ anti-M-CSF monoclonal antibodies are provided. The phrase "Human Engineered™ antibody" refers to an antibody derived from a non-human antibody, typically a mouse monoclonal antibody. Alternatively, a Human Engineered™ antibody may be derived from a chimeric antibody that retains or substantially retains the antigen binding properties of the parental, non-human, antibody but which exhibits diminished immunogenicity as compared to the parental antibody when administered to humans. The phrase "chimeric antibody," as used herein, refers to an antibody containing sequence derived from two different antibodies (see, e.g., U.S. Patent No. 4,816,567) which typically originate from different species. Most typically, chimeric antibodies comprise human and murine antibody fragments, generally human constant and mouse variable regions.

The phrase "complementarity determining region" or the term "CDR" refers to amino acid sequences which together define the binding affinity and specificity of the natural Fv region of a native immunoglobulin binding site (See, e.g., Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 917 (1987); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No. 91 3242 (1991)). The phrase "constant region" refers to the portion of the antibody molecule that confers effector functions. In the present invention, mouse constant regions are preferably substituted by human constant regions. The constant regions of the subject antibodies are derived from human immunoglobulins. The heavy chain constant region can be selected from any of the five isotypes: alpha, delta, epsilon, gamma or mu.

The antibodies of the present invention are said to be immunospecific or specifically binding if they bind to antigen with a K_a of greater than or equal to about 10^6M^{-1} preferably greater than or equal to about 10^7M^{-1}, more preferably greater than or equal to about 10^8M^{-1}, and most preferably greater than or equal to about 10^9M^{-1}, $10^{10}M^{-1}$, $10^{11}M^{-1}$ or $10^{12}M^{-1}$. The anti-M-CSF antibodies may bind to different naturally occurring forms of M-CSF, including those expressed by the host's/subject's tissues as well as that expressed by the tumor. The monoclonal antibodies disclosed herein, such as RX1, 5H4, MC1, or MC3 antibody, have affinity for M-CSF and are characterized by a dissociation equilibrium constant (Kd) of at least 10^{-4} M, preferably at least about 10^{-7} M to about 10^{-8} M, more preferably at least about 10^{-8}M, 10^{-10}M, 10^{-11}M or 10^{-12}M. Such affinities may be readily determined using conventional techniques, such as by equilibrium dialysis; by using the BIAcore 2000 instrument, using general procedures outlined by the manufacturer; by

radioimmunoassay using ^{125}I labeled M-CSF; or by another method known to the skilled artisan. The affinity data may be analyzed, for example, by the method of Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Thus, it will be apparent that preferred M-CSF antibodies will exhibit a high degree of specificity for M-CSF and will bind with substantially lower affinity to other molecules. Preferred antibodies bind M-CSF with a similar affinity as murine RX1 of Figure 4 binds to M-CSF, exhibit low immunogenicity, and inhibit metastasis of cancer cells when tested in metastatic disease animal models. Other exemplary antibodies bind M-CSF with a similar affinity as murine 5H4, MC1 or MC3 of Figure 13, 14 or 15, respectively, binds to M-CSF.

The antigen to be used for production of antibodies may be, e.g., intact M-CSF or a fragment of M-CSF that retains the desired epitope, optionally fused to another polypeptide that allows the epitope to be displayed in its native conformation. Alternatively, cells expressing M-CSF at their cell surface can be used to generate antibodies. Such cells can be transformed to express M-CSF or may be other naturally occurring cells that express M-CSF. Other forms of M-CSF useful for generating antibodies will be apparent to those skilled in the art.

Polyclonal Antibodies

Polyclonal antibodies are preferably raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an adjuvant. An improved antibody response may be obtained by conjugating the relevant antigen to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, e.g., keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride or other agents known in the art.

Animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, e.g., 100 μg or 5 μg of the protein or conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later, the animals are boosted with 1/5 to {fraction (1/10)} the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. At 7-14 days post-booster injection, the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus.

Preferably, the animal is boosted with the conjugate of the same antigen, but conjugated to a different protein and/or through a different cross-linking reagent. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are suitably used to enhance the immune response.

Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods.

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster or macaque monkey, is immunized as herein described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized in vitro. Lymphocytes then are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984) ;Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Exemplary murine myeloma lines include those derived from MOP-21 and M.C.-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA.

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding

specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an in vitro binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by Scatchard analysis (Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown in vivo as ascites tumors in an animal. The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

Recombinant Production of Antibodies

DNA encoding the monoclonal antibodies may be isolated and sequenced from the hybridoma cells using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). Sequence determination will generally require isolation of at least a portion of the gene or cDNA of interest. Usually this requires cloning the DNA or, preferably, mRNA (i.e., cDNA) encoding the monoclonal antibodies. Cloning is carried out using standard techniques (see, e.g., Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, which is incorporated herein by reference). For example, a cDNA library may be constructed by reverse transcription of polyA+ mRNA, preferably membrane-associated mRNA, and the library screened using probes specific for human immunoglobulin polypeptide gene sequences. In a preferred embodiment, however, the polymerase chain reaction (PCR) is used to amplify cDNAs (or portions of full-lenght cDNAs) encoding an immunoglobulin gene segment of interest (e.g., a light chain variable segment). The amplified sequences can be readily cloned into any suitable vector, e.g., expression vectors, minigene vectors, or phage display vectors. It will be appreciated that the particular method of cloning used not critical, so long as it is possible to determine the sequence of some portion of the immunoglobulin polypeptide of interest. As

used herein, an "isolated" nucleic acid molecule or "isolated" nucleic acid sequence is a nucleic acid molecule that is either (1) identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the nucleic acid or (2) cloned, amplified, tagged, or otherwise distinguished from background nucleic acids such that the sequence of the nucleic acid of interest can be determined, is considered isolated. An isolated nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily express the antibody where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

One source for RNA used for cloning and sequencing is a hybridoma produced by obtaining a B cell from the transgenic mouse and fusing the B cell to an immortal cell. An advantage of using hybridomas is that they can be easily screened, and a hybridoma that produces a human monoclonal antibody of interest selected. Alternatively, RNA can be isolated from B cells (or whole spleen) of the immunized animal. When sources other than hybridomas are used, it may be desirable to screen for sequences encoding immunoglobulins or immunoglobulin polypeptides with specific binding characteristics. One method for such screening is the use of phage display technology. Phage display is described in e.g., Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, and Caton and Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454 (1990), each of which is incorporated herein by reference. In one embodiment using phage display technology, cDNA from an immunized transgenic mouse (e.g., total spleen cDNA) is isolated, the polymerase chain reaction is used to amplify a cDNA sequences that encode a portion of an immunoglobulin polypeptide, e.g., CDR regions, and the amplified sequences are inserted into a phage vector. cDNAs encoding peptides of interest, e.g., variable region peptides with desired binding characteristics, are identified by standard techniques such as panning.

The sequence of the amplified or cloned nucleic acid is then determined. Typically the sequence encoding an entire variable region of the immunoglobulin polypeptide is determined, however, it will sometimes by adequate to sequence only a portion of a variable region, for example, the CDR-encoding portion. Typically the portion sequenced will be at least 30 bases in length, more often based coding for at least about one-third or at least about one-half of the length of the variable region will be sequenced.

Sequencing can be carried out on clones isolated from a cDNA library, or, when PCR is used, after subcloning the amplified sequence or by direct PCR sequencing of the amplified segment. Sequencing is carried out using standard techniques (see, e.g., Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, and Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, which is incorporated herein by reference). By comparing the sequence of the cloned nucleic acid with published sequences of human immunoglobulin genes and cDNAs, one of skill will readily be able to determine, depending on the region sequenced, (i) the germline segment usage of the hybridoma immunoglobulin polypeptide (including the isotype of the heavy chain) and (ii) the sequence of the heavy and light chain variable regions, including sequences resulting from N-region addition and the process of somatic mutation. One source of immunoglobulin gene sequence information is the National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, human embryonic kidney 293 cells (e.g., 293E cells), Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Recombinant production of antibodies is well known in the art.

Expression control sequences refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is operably linked when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, operably linked means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with

conventional practice.

Cell, cell line, and cell culture are often used interchangeably and all such designations herein include progeny. Transformants and transformed cells include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Where distinct designations are intended, it will be clear from the context.

In an alternative embodiment, the amino acid sequence of an immunoglobulin of interest may be determined by direct protein sequencing. Suitable encoding nucleotide sequences can be designed according to a universal codon table.

Amino acid sequence variants of the desired antibody may be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the encoding DNA, or by peptide synthesis. Such variants include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the antibodies. Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the monoclonal, human, humanized, Human Engineered™ or variant antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the antibody.

The invention also provides isolated nucleic acid encoding antibodies of the invention, optionally operably linked to control sequences recognized by a host cell, vectors and host cells comprising the nucleic acids, and recombinant techniques for the production of the antibodies, which may comprise culturing the host cell so that the nucleic acid is expressed and, optionally, recovering the antibody from the host cell culture or culture medium.

For recombinant production of the antibody, the nucleic acid encoding it is

isolated and inserted into a replicable vector for further cloning (amplification of the DNA) or for expression. DNA encoding the monoclonal antibody is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the antibody). Many vectors are available. The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more selective marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence.

(1) Signal sequence component

The antibody of this invention may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which is preferably a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. The signal sequence selected preferably is one that is recognized and processed (i.e., cleaved by a signal peptidase) by the host cell. If prokaryotic host cells do not recognize and process the native antibody signal sequence, the signal sequence may be substituted by a signal sequence selected, for example, from the group of the pectate lyase (e.g., pelB) alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the native signal sequence may be substituted by, *e.g.*, the yeast invertase leader, α factor leader (including Saccharomyces and Kluyveromyces α-factor leaders), or acid phosphatase leader, the C. albicans glucoamylase leader, or the signal described in WO90/13646. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences as well as viral secretory leaders, for example, the herpes simplex gD signal, are available.

The DNA for such precursor region is ligated in reading frame to DNA encoding the antibody.

(2) Origin of replication component

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Generally, in cloning vectors this sequence is one that enables the vector to replicate independently of the host chromosomal DNA, and includes origins of replication or autonomously replicating sequences. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins are useful for cloning

vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (the SV40 origin may typically be used only because it contains the early promoter).

(3) Selective marker component

Expression and cloning vectors may contain a selective gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, neomycin, methotrexate, tetracycline, G418, geneticin, histidinol, or mycophenolic acid (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, *e.g.*, the gene encoding D-alanine racemase for Bacilli.

One example of a selection scheme utilizes a drug to arrest growth of a host cell. Those cells that are successfully transformed with a heterologous gene produce a protein conferring drug resistance and thus survive the selection regimen. Examples of such dominant selection use the drugs methotrexate, neomycin, histidinol, puromycin, mycophenolic acid and hygromycin.

Another example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the antibody-encoding nucleic acid, such as DHFR, thymidine kinase, metallothionein-I and -II, preferably primate metallothionein genes, adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, etc.

For example, cells transformed with the DHFR selection gene are first identified by culturing all of the transformants in a culture medium that contains methotrexate (Mtx), a competitive antagonist of DHFR. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the Chinese hamster ovary (CHO) cell line deficient in DHFR activity.

Alternatively, host cells (particularly wild-type hosts that contain endogenous DHFR) transformed or co-transformed with DNA sequences encoding antibody of the invention, wild-type DHFR protein, and another selectable marker such as aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) can be selected by cell growth in medium containing a selection agent for the selectable marker such as an aminoglycosidic antibiotic, *e.g.*, kanamycin, neomycin, or G418. *See* U.S. Patent No. 4,965,199.

A suitable selection gene for use in yeast is the trp1 gene present in the yeast plasmid YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979)). The trp1 gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example,

ATCC No. 44076 or PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). The presence of the trp1 lesion in the yeast host cell genome then provides an effective environment for detecting transformation by growth in the absence of tryptophan. Similarly, Leu2-deficient yeast strains (ATCC 20,622 or 38,626) are complemented by known plasmids bearing the Leu2 gene. *Ura*3-deficient yeast strains are complemented by plasmids bearing the *ura*3 gene.

In addition, vectors derived from the 1.6 μm circular plasmid pKD1 can be used for transformation of Kluyveromyces yeasts. Alternatively, an expression system for large-scale production of recombinant calf chymosin was reported for K. lactis. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). Stable multi-copy expression vectors for secretion of mature recombinant human serum albumin by industrial strains of Kluyveromyces have also been disclosed. Fleer et al, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

(4) Promoter component

Expression and cloning vectors usually contain a promoter that is recognized by the host organism and is operably linked to the antibody-encoding nucleic acid. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the arabinose (*e.g.*, araB) promoter phoA promoter , β-lactamase and lactose promoter systems, alkaline phosphatase, a tryptophan (trp) promoter system, and hybrid promoters such as the tac promoter. However, other known bacterial promoters are suitable. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding the antibody of the invention.

Promoter sequences are known for eukaryotes. Virtually all eukaryotic genes have an AT-rich region located approximately 25 to 30 bases upstream from the site where transcription is initiated. Another sequence found 70 to 80 bases upstream from the start of transcription of many genes is a CNCAAT region where N may be any nucleotide. At the 3' end of most eukaryotic genes is an AATAAA sequence that may be the signal for addition of the poly A tail to the 3' end of the coding sequence. All of these sequences are suitably inserted into eukaryotic expression vectors.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucose isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657. Yeast enhancers also are advantageously used with yeast promoters.

Antibody transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as Abelson leukemia virus, polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, most preferably cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus, Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, *e.g.*, the actin promoter or an immunoglobulin promoter, from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

The early and late promoters of the SV40 virus are conveniently obtained as an SV40 restriction fragment that also contains the SV40 viral origin of replication. The immediate early promoter of the human cytomegalovirus is conveniently obtained as a HindIII E restriction fragment. A system for expressing DNA in mammalian hosts using the bovine papilloma virus as a vector is disclosed in U.S. Patent No. 4,419,446. A modification of this system is described in U.S. Patent No. 4,601,978. *See* also Reyes et al., *Nature 297*: 598-601 (1982) on expression of human β-interferon cDNA in mouse cells under the control of a thymidine kinase promoter from herpes simplex virus. Alternatively, the rous sarcoma virus long terminal repeat can be used as the promoter.

(5) Enhancer element component

Transcription of a DNA encoding the antibody of this invention by higher eukaryotes is often increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, alpha-fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers. *See* also Yaniv, *Nature 297*: 17-18 (1982) on enhancing elements for activation of eukaryotic promoters. The enhancer may be spliced

into the vector at a position 5' or 3' to the antibody-encoding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

(6) Transcription termination component

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding antibody. One useful transcription termination component is the bovine growth hormone polyadenylation region. *See* WO94/11026 and the expression vector disclosed therein. Another is the mouse immunoglobulin light chain transcription terminator.

(7) Selection and transformation of host cells

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein are the prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells described above. Suitable prokaryotes for this purpose include eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, *Enterobacteriaceae* such as *Escherichia, e.g., E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, e.g., Salmonella typhimurium, Serratia, e.g., Serratia marcescans*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (*e.g., B. licheniformis* 41 P disclosed in DD 266,710 published Apr. 12, 1989), *Pseudomonas* such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. One preferred *E. coli* cloning host is *E. coli* 294 (ATCC 31,446), although other strains such as *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), and *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) are suitable. These examples are illustrative rather than limiting.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeast are suitable cloning or expression hosts for antibody-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae*, or common baker's yeast, is the most commonly used among lower eukaryotic host microorganisms. Howevet, a number of other genera, species, and strains are commonly available and useful herein, such as *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hosts such as, *e.g., K. lactis, K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastors* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* such as

Schwanniomyces occidentalis; and filamentous fungi such as, *e.g.*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* and *A. niger*.

Suitable host cells for the expression of glycosylated antibody are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include plant and insect cells. Numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts such as Spodoptera frugiperda (caterpillar), Aedes aegypti (mosquito), Aedes albopictus (mosquito), Drosophila melanogaster (fruitfly), and Bombyx mori have been identified. A variety of viral strains for transfection are publicly available, *e.g.*, the L-1 variant of Autographa californica NPV and the Bm-5 strain of Bombyx mori NPV, and such viruses may be used as the virus herein according to the present invention, particularly for transfection of Spodoptera frugiperda cells.

Plant cell cultures of cotton, corn, potato, soybean, petunia, tomato, tobacco, lemna, and other plant cells can also be utilized as hosts.

However, interest has been greatest in vertebrate cells, and propagation of vertebrate cells in culture (tissue culture) has become routine procedure. Examples of useful mammalian host cell lines are Chinese hamster ovary cells, including CHOK1 cells (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44, and Chinese hamster ovary cells/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, [Graham et al., *J. Gen Virol. 36*: 59 (1977)]; baby hamster kidney cells (BHK, ATCC CCL 10); mouse sertoli cells (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); monkey kidney cells (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey kidney cells (VERO-76, ATCC CRL-1587); human cervical carcinoma cells (HELA, ATCC CCL 2); canine kidney cells (MDCK, ATCC CCL 34); buffalo rat liver cells (BRL 3A, ATCC CRL 1442); human lung cells (W138, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI cells (Mather et al., Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); MRC 5 cells; FS4 cells; and a human hepatoma line (Hep G2).

Host cells are transformed or transfected with the above-described expression or cloning vectors for antibody production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. In addition, novel vectors and transfected cell lines

with multiple copies of transcription units separated by a selective marker are particularly useful and preferred for the expression of antibodies that target M-CSF.

(8) Culturing the host cells

The host cells used to produce the antibody of this invention may be cultured in a variety of media. Commercially available media such as Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), and Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) are suitable for culturing the host cells. In addition, any of the media described in Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), U.S. Patent Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; or 5,122,469; WO90103430; WO 87/00195; or U.S. Patent Re. No. 30,985 may be used as culture media for the host cells. Any of these media may be supplemented as necessary with hormones and/or other growth factors (such as insulin, transferrin, or epidermal growth factor), salts (such as sodium chloride, calcium, magnesium, and phosphate), buffers (such as HEPES), nucleotides (such as adenosine and thymidine), antibiotics (such as Gentamycin™ drug), trace elements (defined as inorganic compounds usually present at final concentrations in the micromolar range), and glucose or an equivalent energy source. Any other necessary supplements may also be included at appropriate concentrations that would be known to those skilled in the art. The culture conditions, such as temperature, pH, and the like, are those previously used with the host cell selected for expression, and will be apparent to the ordinarily skilled artisan.

(9) Purification of antibody

When using recombinant techniques, the antibody can be produced intracellularly, in the periplasmic space, or directly secreted into the medium, including from microbial cultures. If the antibody is produced intracellularly, as a first step, the particulate debris, either host cells or lysed fragments, is removed, for example, by centrifugation or ultrafiltration. Better et al. Science 240: 1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10: 105 (1990); and Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 457-461 (1993) describe a procedure for isolating antibodies which are secreted to the periplasmic space of *E. coli*. (*See* also, [Carter et al., *Bio/Technology 10*: 163-167 (1992)].

The antibody composition prepared from microbial or mammalian cells can be purified using, for example, hydroxylapatite chromatography cation or avian exchange chromatography, and affinity chromatography, with affinity chromatography being the

preferred purification technique. The suitability of protein A as an affinity ligand depends on the species and isotype of any immunoglobulin Fc domain that is present in the antibody. Protein A can be used to purify antibodies that are based on human γ1, γ2, or γ4 heavy chains (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth. 62*: 1-13 (1983)). Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human γ3 (Guss et al., EMBO J. 5: 15671575 (1986)). The matrix to which the affinity ligand is attached is most often agarose, but other matrices are available. Mechanically stable matrices such as controlled pore glass or poly(styrenedivinyl)benzene allow for faster flow rates and shorter processing times than can be achieved with agarose. Where the antibody comprises a C_H 3 domain, the Bakerbond ABX™resin (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) is useful for purification. Other techniques for protein purification such as fractionation on an ion-exchange column, ethanol precipitation, Reverse Phase HPLC, chromatography on silica, chromatography on heparin SEPHAROSE™ chromatography on an anion or cation exchange resin (such as a polyaspartic acid column), chromatofocusing, SDS-PAGE, and ammonium sulfate precipitation are also available depending on the antibody to be recovered.

Chimeric and humanized antibodies

Because chimeric or humanized antibodies are less immunogenic in humans than the parental mouse monoclonal antibodies, they can be used for the treatment of humans with far less risk of anaphylaxis. Thus, these antibodies may be preferred in therapeutic applications that involve in vivo administration to a human.

Chimeric monoclonal antibodies, in which the variable Ig domains of a mouse monoclonal antibody are fused to human constant Ig domains, can be generated using standard procedures known in the art (See Morrison, S. L., et al. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; and, Boulianne, G. L., et al, Nature 312, 643-646 . (1984)). Although some chimeric monoclonal antibodies have proved less immunogenic in humans, the mouse variable Ig domains can still lead to a significant human anti-mouse response.

Humanized antibodies may be achieved by a variety of methods including, for example: (1) grafting the non-human complementarity determining regions (CDRs) onto a human framework and constant region (a process referred to in the art as humanizing through "CDR grafting"), or, alternatively, (2) transplanting the entire non-human variable domains,

but "cloaking" them with a human-like surface by replacement of surface residues (a process referred to in the art as "veneering"). In the present invention, humanized antibodies will include both "humanized" and "veneered" antibodies. These methods are disclosed in, e.g., Jones et al., Nature 321:522 525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65 92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169 217 (1994); and Kettleborough, C.A. et al., Protein Eng. 4(7):773 83 (1991) each of which is incorporated herein by reference.

In particular, a rodent antibody on repeated in vivo administration in man either alone or as a conjugate will bring about an immune response in the recipient against the rodent antibody; the so-called HAMA response (Human Anti Mouse Antibody). The HAMA response may limit the effectiveness of the pharmaceutical if repeated dosing is required. The immunogenicity of the antibody may be reduced by chemical modification of the antibody with a hydrophilic polymer such as polyethylene glycol or by using the methods of genetic engineering to make the antibody binding structure more human like. For example, the gene sequences for the variable domains of the rodent antibody which bind CEA can be substituted for the variable domains of a human myeloma protein, thus producing a recombinant chimaeric antibody. These procedures are detailed in EP 194276, EP 0120694, EP 0125023, EP 0171496, EP 0173494 and WO 86/01533. Alternatively the gene sequences of the CDRs of the rodent antibody may be isolated or synthesized and substituted for the corresponding sequence regions of a homologous human antibody gene, producing a human antibody with the specificity of the original rodent antibody. These procedures are described in EP 023940, WO 90/07861 and WO91/09967. Alternatively a large number of the surface residues of the variable domain of the rodent antibody may be changed to those residues normally found on a homologous human antibody, producing a rodent antibody which has a surface `veneer` of residues and which will therefore be recognized as self by the human body. This approach has been demonstrated by Padlan et.al. (1991) Mol. Immunol. 28, 489.

CDR grafting involves introducing one or more of the six CDRs from the mouse heavy and light chain variable Ig domains into the appropriate four framework regions of human variable Ig domains is also called CDR grafting. This technique (Riechmann, L., et al., Nature 332, 323 (1988)), utilizes the conserved framework regions (FR1-FR4) as a scaffold to support the CDR loops which are the primary contacts with antigen. A disadvantage of CDR grafting, however, is that it can result in a humanized antibody that has

a substantially lower binding affinity than the original mouse antibody, because amino acids of the framework regions can contribute to antigen binding, and because amino acids of the CDR loops can influence the association of the two variable Ig domains. To maintain the affinity of the humanized monoclonal antibody, the CDR grafting technique can be improved by choosing human framework regions that most closely resemble the framework regions of the original mouse antibody, and by site-directed mutagenesis of single amino acids within the framework or CDRs aided by computer modeling of the antigen binding site (e.g., Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976).

One method of humanizing antibodies comprises aligning the non-human heavy and light chain sequences to human heavy and light chain sequences, selecting and replacing the non-human framework with a human framework based on such alignment, molecular modeling to predict the conformation of the humanized sequence and comparing to the conformation of the parent antibody. This process is followed by repeated back mutation of residues in the CDR region which disturb the structure of the CDRs until the predicted conformation of the humanized sequence model closely approximates the conformation of the non-human CDRs of the parent non-human antibody. Such humanized antibodies may be further derivatized to facilitate uptake and clearance, e.g., via Ashwell receptors (See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,530,101 and 5,585,089 which patents are incorporated herein by reference).

A number of humanizations of mouse monoclonal antibodies by rational design have been reported (See, for example, 20020091240 published July 11, 2002, WO 92/11018 and U.S. Patent No., 5,693,762, U.S. Patent No. 5,766,866.

Amino acid sequence variants

A useful method for identification of certain residues or regions of the antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis," as described by Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (e.g., charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation

per se need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed antibody variants are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intra-sequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody (including antibody fragment) fused to an epitope tag or a salvage receptor epitope. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody, e.g. at the N-terminus or C-terminus.

The term "epitope tagged" refers to the antibody fused to an epitope tag. The epitope tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody there against can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the antibody. The epitope tag preferably is sufficiently unique so that the antibody there against does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least 6 amino acid residues and usually between about 8-50 amino acid residues (preferably between about 9-30 residues). Examples include the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol. 8*: 2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan et al., *Mol. Cell. Biol. 5(12)*: 3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky et al., *Protein Engineering 3(6)*: 547-553 (1990)]. Other exemplary tags are a poly-histidine sequence, generally around six histidine residues, that permits isolation of a compound so labeled using nickel chelation. Other labels and tags, such as the FLAG® tag (Eastman Kodak, Rochester, NY), well known and routinely used in the art, are embraced by the invention.

As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (*e.g.*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, or IgG_4) that is responsible for increasing the in vivo serum half-life of the IgG molecule.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. Substitutional mutagenesis within any of the hypervariable or CDR

regions or framework regions is contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1. The most conservative substitution is found under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in no change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 1, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

TABLE 1

Original	Exemplary	Preferred Residue Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	arg
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu norleucine
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ser

Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;

(2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;

(3) acidic: asp, glu;

(4) basic: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and

(6) aromatic: trp, tyr, phe.

Conservative substitutions involve replacing an amino acid with another member of its class. Non-conservative substitutions involve replacing a member of one of these classes with a member of another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the monoclonal, human, humanized, Human Engineered™ or variant antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment).

Affinity maturation involves preparing and screening antibody variants that have substitutions within the CDRs of a parent antibody and selecting variants that have improved biological properties such as binding affinity relative to the parent antibody. A convenient way for generating such substitutional variants is affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (e.g. 6-7 sites) are mutated to generate all

possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (e.g. binding affinity).

Alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues that contribute significantly to antigen binding. Alternatively, or in addition, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and antigen. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

Antibody variants can also be produced that have a modified glycosylation pattern relative to the parent antibody, for example, deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody, and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the antibody.

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. The presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. Thus, N-linked glycosylation sites may be added to an antibody by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of these tripeptide sequences. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-aceylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used. O-linked glycosylation sites may be added to an antibody by inserting or substituting one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody. By way of example, the amino acids of RX1 at positions 41-43 of Figure 4A (NGS) may be retained. Alternatively, only amino acids 41 and 42 (NG) may be retained.

Ordinarily, amino acid sequence variants of the Human Engineered™ antibody will have an amino acid sequence having at least 60% amino acid sequence identity

35

with the original Human Engineered™ antibody amino acid sequences of either the heavy or the light chain *(e.g.,* as in any of Figures 19B through 22B) more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95%, including for example, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, and 100%. Identity or homology with respect to this sequence is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the Human Engineered™ residues, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions (as defined in Table 1 above) as part of the sequence identity. None of N-terminal, C-terminal, or internal extensions, deletions, or insertions into the antibody sequence shall be construed as affecting sequence identity or homology. Thus, sequence identity can be determined by standard methods that are commonly used to compare the similarity in position of the amino acids of two polypeptides. Using a computer program such as BLAST or FASTA, two polypeptides are aligned for optimal matching of their respective amino acids (either along the full length of one or both sequences, or along a pre-determined portion of one or both sequences). The programs provide a default opening penalty and a default gap penalty, and a scoring matrix such as PAM 250 [a standard scoring matrix; see Dayhoff et al., in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, supp. 3 (1978)] can be used in conjunction with the computer program. For example, the percent identity can then be calculated as: the total number of identical matches multiplied by 100 and then divided by the sum of the length of the longer sequence within the matched span and the number of gaps introduced into the longer sequences in order to align the two sequences.

Other modifications of the antibody are contemplated. For example, it may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance the effectiveness of the antibody in treating cancer, for example. For example cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *See* Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody

can be engineered which has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. *See* Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design 3*: 219-230 (1989). In addition, it has been shown that sequences within the CDR can cause an antibody to bind to MHC Class II and trigger an unwanted helper T-cell response. A conservative substitution can allow the antibody to retain binding activity yet lose its ability to trigger an unwanted T-cell response. Also see Steplewski et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4852-6, incorporated herein by reference in its entirety, which described chimeric antibodies wherein a murine variable region was joined with human gamma 1, gamma 2, gamma 3, and gamma 4 constant regions.

In certain embodiments of the invention, it may be desirable to use an antibody fragment, rather than an intact antibody, to increase tumor penetration, for example. In this case, it may be desirable to modify the antibody fragment in order to increase its serum half-life, for example, adding molecules such as PEG or other water soluble polymers, including polysaccharide polymers, to antibody fragments to increase the half-life. This may also be achieved, for example, by incorporation of a salvage receptor binding epitope into the antibody fragment (*e.g.*, by mutation of the appropriate region in the antibody fragment or by incorporating the epitope into a peptide tag that is then fused to the antibody fragment at either end or in the middle, *e.g.*, by DNA or peptide synthesis) (*see, e.g.*, WO96/32478).

The salvage receptor binding epitope preferably constitutes a region wherein any one or more amino acid residues from one or two loops of a Fc domain are transferred to an analogous position of the antibody fragment. Even more preferably, three or more residues from one or two loops of the Fc domain are transferred. Still more preferred, the epitope is taken from the CH2 domain of the Fc region (e.g., of an IgG) and transferred to the CH1, CH3, or VH region, or more than one such region, of the antibody. Alternatively, the epitope is taken from the CH2 domain of the Fc region and transferred to the C.sub.L region or V.sub.L region, or both, of the antibody fragment. See also International applications WO 97/34631 and WO 96/32478 which describe Fc variants and their interaction with the salvage receptor.

Thus, antibodies of the invention may comprise a human Fc portion, a human consensus Fc portion, or a variant thereof that retains the ability to interact with the Fc salvage receptor, including variants in which cysteines involved in disulfide bonding are modified or removed, and/or in which the a met is added at the N-terminus and/or one or more of the N-terminal 20 amino acids are removed, and/or regions that interact with

36

complement, such as the C1q binding site, are removed, and/or the ADCC site is removed [see, e.g., Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992)].

Previous studies mapped the binding site on human and murine IgG for FcR primarily to the lower hinge region composed of IgG residues 233-239. Other studies proposed additional broad segments, e.g. Gly316-Lys338 for human Fc receptor I, Lys274-Arg301 and Tyr407-Arg416 for human Fc receptor III, or found a few specific residues outside the lower hinge, e.g. Asn297 and Glu318 for murine IgG2b interacting with murine Fc receptor II. The report of the 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment with human Fc receptor IIIA delineated IgG1 residues Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, and Ala327-Ile332 as involved in binding to Fc receptor IIIA. It has been suggested based on crystal structure that in addition to the lower hinge (Leu234-Gly237), residues in IgG CH2 domain loops FG (residues 326-330) and BC (residues 265-271) might play a role in binding to Fc receptor IIA. See Shields et al., J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001), incorporated by reference herein in its entirety. Mutation of residues within Fc receptor binding sites can result in altered effector function, such as altered ADCC or CDC activity, or altered half-life. As described above, potential mutations include insertion, deletion or substitution of one or more residues, including substitution with alanine, a conservative substitution, a non-conservative substitution, or replacement with a corresponding amino acid residue at the same position from a different IgG subclass (e.g. replacing an IgG1 residue with a corresponding IgG2 residue at that position).

Shields et al. reported that IgG1 residues involved in binding to all human Fc receptors are located in the CH2 domain proximal to the hinge and fall into two categories as follows: 1) positions that may interact directly with all FcR include Leu234-Pro238, Ala327, and Pro329 (and possibly Asp265); 2) positions that influence carbohydrate nature or position include Asp265 and Asn297. The additional IgG1 residues that affected binding to Fc receptor II are as follows: (largest effect) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, and (less effect) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378, and Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A and D270A reduced binding. In addition to the residues identified above for all FcR, additional IgG1 residues that reduced binding to Fc receptor IIIA by 40% or more are as follows: Ser239, Ser267 (Gly only), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338, and Asp376. Variants that improved binding to FcRIIIA include T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, and A339T.

Lys414 showed a 40% reduction in binding for FcRIIA and FcRIIB, Arg416 a 30% reduction for FcRIIA and FcRIIIA, Gln419 a 30% reduction to FcRIIA and a 40% reduction to FcRIIB, and Lys360 a 23% improvement to FcRIIIA. See also Presta et al., Biochem. Soc. Trans. (2001) 30, 487–490.

For example, United States Patent No. 6,194,551, incorporated herein by reference in its entirety, describes variants with altered effector function containing mutations in the human IgG Fc region, at amino acid position 329, 331 or 322 (using Kabat numbering), some of which display reduced C1q binding or CDC activity. As another example, United States Patent No. 6,737,056, incorporated herein by reference in its entirety, describes variants with altered effector or Fc-gamma-receptor binding containing mutations in the human IgG Fc region, at amino acid position 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439 (using Kabat numbering), some of which display receptor binding profiles associated with reduced ADCC or CDC activity. Of these, a mutation at amino acid position 238, 265, 269, 270, 327 or 329 are stated to reduce binding to FcRI, a mutation at amino acid position 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 or 439 are stated to reduce binding to FcRII, and a mutation at amino acid position 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 or 437 is stated to reduce binding to FcRIII.

United States Patent No. 5,624,821, incorporated by reference herein in its entirety, reports that Clq binding activity of an murine antibody can be altered by mutating amino acid residue 318, 320 or 322 of the heavy chain and that replacing residue 297 (Asn) results in removal of lytic activity.

United States Application Publication No. 20040132101, incorporated by reference herein in its entirety, describes variants with mutations at amino acid positions 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328, or 332 (using Kabat numbering) or positions 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, or 332 (using Kabat numbering), of which mutations at positions 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, or 332 may reduce ADCC

activity or reduce binding to an Fc gamma receptor.

Chappel et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(20):9036-40, incorporated herein by reference in its entirety, report that cytophilic activity of IgG1 is an intrinsic property of its heavy chain CH2 domain. Single point mutations at any of amino acid residues 234-237 of IgG1 significantly lowered or abolished its activity. Substitution of all of IgG1 residues 234-237 (LLGG) into IgG2 and IgG4 were required to restore full binding activity. An IgG2 antibody containing the entire ELLGGP sequence (residues 233-238) was observed to be more active than wild-type IgG1.

Isaacs et al., J Immunol. 1998;161(8):3862-9, incorporated herein by reference in its entirety, report that mutations within a motif critical for Fc gammaR binding (glutamate 233 to proline, leucine/phenylalanine 234 to valine, and leucine 235 to alanine) completely prevented depletion of target cells. The mutation glutamate 318 to alanine eliminated effector function of mouse IgG2b and also reduced the potency of human IgG4.

Armour et al., Mol Immunol. 2003;40(9):585-93, incorporated by reference herein in its entirety, identified IgG1 variants which react with the activating receptor, FcgammaRIIa, at least 10-fold less efficiently than wildtype IgG1 but whose binding to the inhibitory receptor, FcgammaRIIb, is only four-fold reduced. Mutations were made in the region of amino acids 233-236 and/or at amino acid positions 327, 330 and 331. See also WO 99/58572, incorporated by referehce herein in its entirety.

Xu et al., J Biol Chem. 1994;269(5):3469-74, incorporated by reference herein in its entirety, report that mutating IgG1 Pro331 to Ser markedly decreased C1q binding and virually eliminated lytic activity. In contrast, the substitution of Pro for Ser331 in IgG4 bestowed partial lytic activity (40%) to the IgG4 Pro331 variant.

Schuurman et al,. Mol Immunol. 2001;38(1):1-8, incorporated by reference herein in its entirety, report that mutating one of the hinge cysteines involved in the inter-heavy chain bond formation, Cys226, to serine resulted in a more stable inter-heavy chain linkage. Mutating the IgG4 hinge sequence Cys-Pro-Ser-Cys to the IgG1 hinge sequence Cys-Pro-Pro-Cys also markedly stabilizes the covalent interaction between the heavy chains.

Angal et al., Mol Immunol. 1993;30(1):105-8, incorporated by reference herein in its entirety, report that mutating the serine at amino acid position 241 in IgG4 to proline (found at that position in IgG1 and IgG2) led to the production of a homogeneous antibody, as well as extending serum half-life and improving tissue distribution compared to

the original chimeric IgG4.

Human and Human Engineered™ antibodies

Human Engineering™

Human Engineering™ of antibody variable domains has been described by Studnicka [See, e.g., Studnicka et al. U.S. Patent No. 5,766,886; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] as a method for reducing immunogenicity while maintaining binding activity of antibody molecules. According to the method, each variable region amino acid has been assigned a risk of substitution. Amino acid substitutions are distinguished by one of three risk categories : (1) low risk changes are those that have the greatest potential for reducing immunogenicity with the least chance of disrupting antigen binding; (2) moderate risk changes are those that would further reduce immunogenicity, but have a greater chance of affecting antigen binding or protein folding; (3) high risk residues are those that are important for binding or for maintaining antibody structure and carry the highest risk that antigen binding or protein folding will be affected. Due to the three-dimensional structural role of prolines, modifications at prolines are generally considered to be at least moderate risk changes, even if the position is typically a low risk position.

Variable regions of the light and heavy chains of a rodent antibody are Human Engineered™ as follows to substitute human amino acids at positions determined to be unlikely to adversely effect either antigen binding or protein folding, but likely to reduce immunogenicity in a human environment. Amino acid residues that are at "low risk" positions and that are candidates for modification according to the method are identified by aligning the amino acid sequences of the rodent variable regions with a human variable region sequence. Any human variable region can be used, including an individual VH or VL sequence or a human consensus VH or VL sequence or an individual or consensus human germline sequence. The amino acid residues at any number of the low risk positions, or at all of the low risk positions, can be changed. For example, at each low risk position where the aligned murine and human amino acid residues differ, an amino acid modification is introduced that replaces the rodent residue with the human residue. Alternatively, the amino acid residues at all of the low risk positions and at any number of the moderate risk positions can be changed. Ideally, to achieve the least immunogenicity all of the low and moderate risk positions are changed from rodent to human sequence.

Synthetic genes containing modified heavy and/or light chain variable regions

are constructed and linked to human γ heavy chain and/or kappa light chain constant regions. Any human heavy chain and light chain constant regions may be used in combination with the Human Engineered™ antibody variable regions, including IgA (of any subclass, such as IgA1 or IgA2), IgD, IgE, IgG (of any subclass, such as IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4), or IgM. The human heavy and light chain genes are introduced into host cells, such as mammalian cells, and the resultant recombinant immunoglobulin products are obtained and characterized.

Human antibodies from transgenic animals

Human antibodies to M-CSF can also be produced using transgenic animals that have no endogenous immunoglobulin production and are engineered to contain human immunoglobulin loci. For example, WO 98/24893 discloses transgenic animals having a human Ig locus wherein the animals do not produce functional endogenous immunoglobulins due to the inactivation of endogenous heavy and light chain loci. WO 91/741 also discloses transgenic non-primate mammalian hosts capable of mounting an immune response to an immunogen, wherein the antibodies have primate constant and/or variable regions, and wherein the endogenous immunoglobulin encoding loci are substituted or inactivated. WO 96/30498 discloses the use of the Cre/Lox system to modify the immunoglobulin locus in a mammal, such as to replace all or a portion of the constant or variable region to form a modified antibody molecule. WO 94/02602 discloses non-human mammalian hosts having inactivated endogenous Ig loci and functional human Ig loci. U.S. Patent No. 5,939,598 discloses methods of making transgenic mice in which the mice lack endogenous heavy chains, and express an exogenous immunoglobulin locus comprising one or more xenogeneic constant regions.

Using a transgenic animal described above, an immune response can be produced to a selected antigenic molecule, and antibody producing cells can be removed from the animal and used to produce hybridomas that secrete human monoclonal antibodies. Immunization protocols, adjuvants, and the like are known in the art, and are used in immunization of, for example, a transgenic mouse as described in WO 96/33735. This publication discloses monoclonal antibodies against a variety of antigenic molecules including IL 6, IL 8, TNFa, human CD4, L selectin, gp39, and tetanus toxin. The monoclonal antibodies can be tested for the ability to inhibit or neutralize the biological activity or physiological effect of the corresponding protein. WO 96/33735 discloses that monoclonal antibodies against IL-8, derived from immune cells of transgenic mice immunized with IL-8, blocked IL-8 induced functions of neutrophils. Human monoclonal

antibodies with specificity for the antigen used to immunize transgenic animals are also disclosed in WO 96/34096 and U.S. patent application no. 20030194404; and U.S. patent application no. 20030031667).

See also Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); and U.S. Pat. No. 5,591,669, U.S. Patent No. 5,589,369, U.S. Patent No. 5,545,807; and U.S Patent Application No. 20020199213. U.S. Patent Application No. and 20030092125 describes methods for biasing the immune response of an animal to the desired epitope. Human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells (see U.S. Pat. Nos. 5,567,610 and 5,229,275).

Human antibodies from phage display technology

The development of technologies for making repertoires of recombinant human antibody genes, and the display of the encoded antibody fragments on the surface of filamentous bacteriophage, has provided a means for making human antibodies directly. The antibodies produced by phage technology are produced as antigen binding fragments-usually Fv or Fab fragments-in bacteria and thus lack effector functions. Effector functions can be introduced by one of two strategies: The fragments can be engineered either into complete antibodies for expression in mammalian cells, or into bispecific antibody fragments with a second binding site capable of triggering an effector function.

Typically, the Fd fragment (V_H-C_H1) and light chain (V_L-C_L) of antibodies are separately cloned by PCR and recombined randomly in combinatorial phage display libraries, which can then be selected for binding to a particular antigen. The Fab fragments are expressed on the phage surface, i.e., physically linked to the genes that encode them. Thus, selection of Fab by antigen binding co-selects for the Fab encoding sequences, which can be amplified subsequently. By several rounds of antigen binding and re-amplification, a procedure termed panning, Fab specific for the antigen are enriched and finally isolated.

In 1994, an approach for the humanization of antibodies, called "guided selection", was described. Guided selection utilizes the power of the phage display technique for the humanization of mouse monoclonal antibody (See Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). For this, the Fd fragment of the mouse monoclonal antibody can be displayed in combination with a human light chain library, and the resulting hybrid Fab library may then be selected with antigen. The mouse Fd fragment thereby

provides a template to guide the selection. Subsequently, the selected human light chains are combined with a human Fd fragment library. Selection of the resulting library yields entirely human Fab.

A variety of procedures have been described for deriving human antibodies from phage-display libraries (See, for example, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991); U.S. Pat. Nos. 5,565,332 and 5,573,905; Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). In particular, in vitro selection and evolution of antibodies derived from phage display libraries has become a powerful tool (See Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); and, Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); U.S. patent application no. 20020004215 and WO92/01047; U.S. patent application no. 20030190317 published October 9, 2003 and U.S. Patent No. 6,054,287; U.S. Patent No. 5,877,293.

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193, and U.S. patent application no. 200120030044772 published March 6, 2003 describe methods for screening phage-expressed antibody libraries or other binding molecules by capture lift, a method involving immobilization of the candidate binding molecules on a solid support.

The antibody products may be screened for activity and for suitability in the treatment methods of the invention using assays as described in the section entitled "Screening Methods" herein or using any suitable assays known in the art.

Other covalent modifications

Covalent modifications of the antibody are also included within the scope of this invention. They may be made by chemical synthesis or by enzymatic or chemical cleavage of the antibody, if applicable. Other types of covalent modifications of the antibody are introduced into the molecule by reacting targeted amino acid residues of the antibody with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues.

Cysteinyl residues most commonly are reacted with α-haloacetates (and corresponding amines), such as chloroacetic acid or chloroacetamide, to give carboxymethyl or carboxyamidomethyl derivatives. Cysteinyl residues also are derivatized by reaction with bromotrifluoroacetone, .alpha.-bromo-β-(5-imidozoyl)propionic acid, chloroacetyl phosphate,

N-alkylmaleimides, 3-nitro-2-pyridyl disulfide, methyl 2-pyridyl disulfide, p-chloromercuribenzoate, 2-chloromercuri-4-nitrophenol, or chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

Histidyl residues are derivatized by reaction with diethylpyrocarbonate at pH 5.5-7.0 because this agent is relatively specific for the histidyl side chain. Para-bromophenacyl bromide also is useful; the reaction is preferably performed in 0.1 M sodium cacodylate at pH 6.0.

Lysinyl and amino-terminal residues are reacted with succinic or other carboxylic acid anhydrides. Derivatization with these agents has the effect of reversing the charge of the lysinyl residues. Other suitable reagents for derivatizing .alpha.-amino-containing residues include imidoesters such as methyl picolinimidate, pyridoxal phosphate, pyridoxal, chloroborohydride, trinitrobenzenesulfonic acid, O-methylisourea, 2,4-pentanedione, and transaminase-catalyzed reaction with glyoxylate.

Arginyl residues are modified by reaction with one or several conventional reagents, among them phenylglyoxal, 2,3-butanedione, 1,2-cyclohexanedione, and ninhydrin. Derivatization of arginine residues requires that the reaction be performed in alkaline conditions because of the high pK_a of the guanidine functional group. Furthermore, these reagents may react with the groups of lysine as well as the arginine epsilon-amino group.

The specific modification of tyrosyl residues may be made, with particular interest in introducing spectral labels into tyrosyl residues by reaction with aromatic diazonium compounds or tetranitromethane. Most commonly, N-acetylimidizole and tetranitromethane are used to form O-acetyl tyrosyl species and 3-nitro derivatives, respectively. Tyrosyl residues are iodinated using ^{125}I or ^{131}I to prepare labeled proteins for use in radioimmunoassay.

Carboxyl side groups (aspartyl or glutamyl) are selectively modified by reaction with carbodiimides (R-N.dbd.C.dbd.N-R'), where R and R' are different alkyl groups, such as 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide or 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl) carbodiimide. Furthermore, aspartyl and glutamyl residues are converted to asparaginyl and glutaminyl residues by reaction with ammonium ions.

Glutaminyl and asparaginyl residues are frequently deamidated to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively. These residues are deamidated under neutral or basic conditions. The deamidated form of these residues falls within the

scope of this invention.

Other modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the .alpha.-amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification involves chemically or enzymatically coupling glycosides to the antibody. These procedures are advantageous in that they do not require production of the antibody in a host cell that has glycosylation capabilities for N- or O-linked glycosylation. Depending on the coupling mode used, the sugar(s) may be attached to (a) arginine and histidine, (b) free carboxyl groups, (c) free sulfhydryl groups such as those of cysteine, (d) free hydroxyl groups such as those of serine, threonine, or hydroxyproline, (e) aromatic residues such as those of phenylalanine, tyrosine, or tryptophan, or (f) the amide group of glutamine. These methods are described in WO87/05330 published 11 Sep. 1987, and in Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

Removal of any carbohydrate moieties present on the antibody may be accomplished chemically or enzymatically. Chemical deglycosylation requires exposure of the antibody to the compound trifluoromethanesulfonic acid, or an equivalent compound. This treatment results in the cleavage of most or all sugars except the linking sugar (N-acetylglucosamine or N-acetylgalactosamine), while leaving the antibody intact. Chemical deglycosylation is described by Hakimuddin, et al. Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) and by Edge et al. Anal. Biochem., 118: 131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on antibodies can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura et al. Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

Another type of covalent modification of the antibody comprises linking the antibody to one of a variety of nonproteinaceous polymers, *e.g.*, polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyoxyethylated polyols, polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, polyoxyethylated glycerol, polyoxyalkylenes, or polysaccharide polymers such as dextran. Such methods are known in the art, see, e.g. U.S. Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192, 4,179,337, 4,766,106, 4,179,337, 4,495,285, 4,609,546or EP 315 456.

Gene Therapy

Delivery of a therapeutic antibody to appropriate cells can be effected via gene therapy ex vivo, in situ, or in vivo by use of any suitable approach known in the art, including by use of physical DNA transfer methods (e.g., liposomes or chemical treatments) or by use of viral vectors (e.g., adenovirus, adeno-associated virus, or a retrovirus). For example, for in vivo therapy, a nucleic acid encoding the desired antibody, either alone or in conjunction with a vector, liposome, or precipitate may be injected directly into the subject, and in some embodiments, may be injected at the site where the expression of the antibody compound is desired. For ex vivo treatment, the subject's cells are removed, the nucleic acid is introduced into these cells, and the modified cells are returned to the subject either directly or, for example, encapsulated within porous membranes which are implanted into the patient. See, e.g. U.S. Pat. Nos. 4,892,538 and 5,283,187. There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into cultured cells in vitro, or in vivo in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells in vitro include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, and calcium phosphate precipitation. A commonly used vector for ex vivo delivery of a nucleic acid is a retrovirus.

Other in vivo nucleic acid transfer techniques include transfection with viral vectors (such as adenovirus, Herpes simplex I virus, or adeno-associated virus) and lipid-based systems. The nucleic acid and transfection agent are optionally associated with a microparticle. Exemplary transfection agents include calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, quaternary ammonium amphiphile DOTMA ((dioleoyloxypropyl) trimethylammonium bromide, commercialized as Lipofectin by GIBCO-BRL))(Felgner et al, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone et al. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 6077-6081); lipophilic glutamate diesters with pendent trimethylammonium heads (Ito et al. (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); the metabolizable parent lipids such as the cationic lipid dioctadecylamido glycylspermine (DOGS, Transfectam, Promega) and dipalmitoylphosphatidyl ethanolamylspermine (DPPES)(J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986); metabolizable quaternary ammonium salts (DOTB, N-(1-[2,3-dioleoyloxy]propyl)-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP)(Boehringer Mannheim), polyethyleneimine (PEI), dioleoyl esters, ChoTB, ChoSC, DOSC)(Leventis et al. (1990) Biochim. Inter. 22, 235-241); 3beta[N-(N', N'-

dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol (DC-Chol), dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE)/3beta[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterolDC-Chol in one to one mixtures (Gao et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14), spermine, spermidine, lipopolyamines (Behr et al., Bioconjugate Chem, 1994, 5: 382-389), lipophilic polylysines (LPLL) (Zhou et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), [[(1,1,3,3-tetramethylbutyl)cre- soxy]ethoxy]ethyl]dimethylbe nzylammonium hydroxide (DEBDA hydroxide) with excess phosphatidylcholine/cholesterol (Ballas et al., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)/DOPE mixtures (Pinnaduwage et al, (1989) Biochim. Biophys. Acta 985, 33-37), lipophilic diester of glutamic acid (TMAG) with DOPE, CTAB, DEBDA, didodecylammonium bromide (DDAB), and stearylamine in admixture with phosphatidylethanolamine (Rose et al., (1991) Biotechnique 10, 520-525), DDAB/DOPE (TransfectACE, GIBCO BRL), and oligogalactose bearing lipids. Exemplary transfection enhancer agents that increase the efficiency of transfer include, for example, DEAE-dextran, polybrene, lysosome-disruptive peptide (Ohmori N I et al, Biochem Biophys Res Commun Jun. 27, 1997;235(3):726-9), chondroitan-based proteoglycans, sulfated proteoglycans, polyethylenimine, polylysine (Pollard H et al. J Biol Chem, 1998 273 (13):7507-11), integrin-binding peptide CYGGRGDTP, linear dextran nonasaccharide, glycerol, cholesteryl groups tethered at the 3'-terminal internucleoside link of an oligonucleotide (Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: (17):6553-6), lysophosphatide, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylethanolamine, and 1-oleoyl lysophosphatidylcholine.

In some situations it may be desirable to deliver the nucleic acid with an agent that directs the nucleic acid-containing vector to target cells. Such "targeting" molecules include antibodies specific for a cell-surface membrane protein on the target cell, or a ligand for a receptor on the target cell. Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell-surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake. Examples of such proteins include capsid proteins and fragments thereof tropic for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, and proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. In other embodiments, receptor-mediated endocytosis can be used. Such methods are described, for example, in Wu et al., 1987 or Wagner et al., 1990. For review of the currently known gene marking and gene therapy protocols, see Anderson 1992. See also WO 93/25673 and the references cited therein. For additional reviews of gene therapy technology, see

Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); and Miller, Nature, 357: 455460 (1992).

Screening Methods

Effective therapeutics depend on identifying efficacious agents devoid of significant toxicity. Antibodies may be screened for binding affinity by methods known in the art. For example, gel-shift assays, Western blots, radiolabeled competition assay, co-fractionation by chromatography, co-precipitation, cross linking, ELISA, and the like may be used, which are described in, for example, Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY, which is incorporated herein by reference in its entirety.

To initially screen for antibodies which bind to the desired epitope on M-CSF (*e.g.*, those which block binding of RX1, 5H4, MC1 and/or MC3 to M-CSF), a routine cross-blocking assay such as that described in Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. Routine competitive binding assays may also be used, in which the unknown antibody is characterized by its ability to inhibit binding of M-CSF to an M-CSF specific antibody of the invention. Intact M-CSF, fragments thereof, or linear epitopes such as represented by amino acids 98-105 of M-CSF of Figure 12, or amino acids 65-73 or 138-144 of Figure 12 (corresponding to M-CSF epitopes recognized by 5H4 or MC3), can be used. Epitope mapping is described in Champe et al., J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995).

It is further contemplated that the antibodies are next tested for their effect on osteoclastogenesis, followed by administration to animals. Compounds potentially useful in preventing or treating bone loss associated with cancer metastasis may be screened using various assays. For instance, a candidate antagonist may first be characterized in a cultured cell system to determine its ability to neutralize M-CSF in inducing osteoclastogenesis. Such a system may include the co-culture of mouse calvarial osteoblasts and spleen cells (Suda et al., Modulation of osteoclast differentiation. Endocr. Rev. 13: 66 80, 1992; Martin and Udagawa, Trends Endocrinol. Metab. 9: 6-12, 1998), the co-culture of mouse stromal cell lines (e.g., MC3T3-G2/PA6 and ST2) and mouse spleen cells (Udagawa et al., Endocrinology 125: 1805 13, 1989), and the co-culture of ST2 cells and bone marrow cells, peripheral blood mononuclear cells or alveolar macrophages (Udagawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7260 4, 1990; Sasaki et al., Cancer Res. 58: 462 7, 1998; Mancino et al., J. Surg. Res.100: 18-

24, 2001). In the absence of any M-CSF antagonist, multinucleated cells formed in such co-cultures satisfy the major criteria of osteoclasts such as tartrate resistant acid phosphatase (TRAP, a marker enzyme of osteoclasts) activity, calcitonin receptors, p60C-STC, vitronectin receptors, and the ability to form resorption pits on bone and dentine slices. The presence of an effective M-CSF antagonist inhibits the formation of such multinucleated cells.

In addition to the above co-culture systems, the ability of a candidate M-CSF antibody in inhibiting osteoclastogenesis may be assayed in a stromal cell-free or osteoblast-free system. The M-CSF required for osteoclastogenesis may be provided by co-cultured metastatic cancer cells (e.g., MDA 231) or conditioned medium from these cancer cells (Mancino et al., J. Surg. Res. 0: 18-24, 2001) or by addition of purified M-CSF.

Efficacy of a given M-CSF antibody in preventing or treating bone loss associated with cancer metastasis may also be tested in any of the animal bone metastasis model systems familiar to those skilled in the art. Such model systems include those involving direct injection of tumor cells into the medullary cavity of bones (Ingall, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117: 819-22, 1964; Falasko, Clin. Orthop. 169: 20 7, 1982), into the rat abdominal aorta (Powles et al., Br. J. Cancer 28: 316 21, 1973), into the mouse lateral tail vein or into the mouse left ventricle (Auguello et al., Cancer Res. 48: 6876 81, 1988). In the absence of an effective M-CSF antagonist, osteolytic bone metastases formed from injected tumor cells may be determined by radiographs (areas of osteolytic bone lesions) or histology and immunohistochemistry (bone and soft tissues). Sasaki et al., Cancer Res. 55: 3551 7, 1995; Yoneda et al., J. Clin. Invest. 99: 2509 17, 1997. Clohisy and Ramnaraine, Orthop Res. 16: 660 6, 1998. Yin et al., J. Clin. Invest. 103: 197 206, 1999. In the presence of an effective M-CSF antibody, osteolytic bone metastases may be prevented, or inhibited to result in fewer and/or smaller metastases.

The M-CSF antibodies of the present invention may also be useful in preventing or treating cancer metastasis. The effectiveness of a candidate M-CSF antibody in preventing or treating cancer metastasis may be screened using a human amnionic basement membrane invasion model as described in Filderman et al., Cancer Res 52: 36616, 1992. In addition, any of the animal model systems for metastasis of various types of cancers may also be used. Such model systems include, but are not limited to, those described in Wenger et al., Clin. Exp. Metastasis 19: 169 73, 2002; Yi et al., Cancer Res. 62: 917 23, 2002; Tsutsumi et al., Cancer Lett 169: 77-85, 2001; Tsingotjidou et al., Anticancer Res. 21: 971 8, 2001; Wakabayashi et al., Oncology 59: 75 80, 2000; Culp and Kogerman, Front Biosci. 3:D672

83, 1998; Runge et al., Invest Radiol. 32: 212 7; Shioda et al., J. Surg. Oncol. 64: 122 6, 1997; Ma et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 37: 2293 301, 1996; Kuruppu et al., J Gastroenterol Hepatol. 11: 26 32, 1996. In the presence of an effective M-CSF antibody, cancer metastases may be prevented, or inhibited to result in fewer and/or smaller metastases.

The anti-tumor activity of a particular M-CSF antibody, or combination of M-CSF antibodies, may be evaluated *in vivo* using a suitable animal model. For example, xenogenic lymphoma cancer models wherein human lymphoma cells are introduced into immune compromised animals, such as nude or SCID mice. Efficacy may be predicted using assays which measure inhibition of tumor formation, tumor regression or metastasis, and the like.

In one variation of an *in vitro* assay, the invention provides a method comprising the steps of (a) contacting an immobilized M-CSF with a candidate antibody and (b) detecting binding of the candidate antibody to the M-CSF. In an alternative embodiment, the candidate antibody is immobilized and binding of M-CSF is detected. Immobilization is accomplished using any of the methods well known in the art, including covalent bonding to a support, a bead, or a chromatographic resin, as well as non-covalent, high affinity interaction such as antibody binding, or use of streptavidin/biotin binding wherein the immobilized compound includes a biotin moiety. Detection of binding can be accomplished (i) using a radioactive label on the compound that is not immobilized, (ii) using a fluorescent label on the non-immobilized compound, (iii) using an antibody immunospecific for the non-immobilized compound, (iv) using a label on the non-immobilized compound that excites a fluorescent support to which the immobilized compound is attached, as well as other techniques well known and routinely practiced in the art.

Antibodies that modulate (i.e., increase, decrease, or block) the activity or expression of M-CSF may be identified by incubating a putative modulator with a cell expressing a M-CSF and determining the effect of the putative modulator on the activity or expression of the M-CSF. The selectivity of an antibody that modulates the activity of a M-CSF polypeptide or polynucleotide can be evaluated by comparing its effects on the M-CSF polypeptide or polynucleotide to its effect on other related compounds. Selective modulators may include, for example, antibodies and other proteins, peptides, or organic molecules which specifically bind to M-CSF polypeptides or to a nucleic acid encoding a M-CSF polypeptide. Modulators of M-CSF activity will be therapeutically useful in treatment of diseases and physiological conditions in which normal or aberrant activity of M-CSF

polypeptide is involved.

The invention also comprehends high throughput screening (HTS) assays to identify antibodies that interact with or inhibit biological activity (i.e., inhibit enzymatic activity, binding activity, etc.) of a M-CSF polypeptide. HTS assays permit screening of large numbers of compounds in an efficient manner. Cell-based HTS systems are contemplated to investigate the interaction between M-CSF polypeptides and their binding partners. HTS assays are designed to identify "hits" or "lead compounds" having the desired property, from which modifications can be designed to improve the desired property. Chemical modification of the "hit" or "lead compound" is often based on an identifiable structure/activity relationship between the "hit" and M-CSF polypeptides.

Another aspect of the present invention is directed to methods of identifying antibodies which modulate (i.e., decrease) activity of a M-CSF comprising contacting a M-CSF with an antibody, and determining whether the antibody modifies activity of the M-CSF. The activity in the presence of the test antibody is compared to the activity in the absence of the test antibody. Where the activity of the sample containing the test antibody is lower than the activity in the sample lacking the test antibody, the antibody will have inhibited activity.

A variety of heterologous systems is available for functional expression of recombinant polypeptides that are well known to those skilled in the art. Such systems include bacteria (Strosberg, et al., Trends in Pharmacological Sciences (1992) 13:95-98), yeast (Pausch, Trends in Biotechnology (1997) 15:487-494), several kinds of insect cells (Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology (1996) 164:189-268), amphibian cells (Jayawickreme et al., Current Opinion in Biotechnology (1997) 8: 629-634) and several mammalian cell lines (CHO, HEK293, COS, etc.; see Gerhardt, et al., Eur. J. Pharmacology (1997) 334:1-23). These examples do not preclude the use of other possible cell expression systems, including cell lines obtained from nematodes (PCT application WO 98/37177).

In one embodiment of the invention, methods of screening for antibodies which modulate the activity of M-CSF comprise contacting test antibodies with a M-CSF polypeptide and assaying for the presence of a complex between the antibody and the M-CSF. In such assays, the ligand is typically labeled. After suitable incubation, free ligand is separated from that present in bound form, and the amount of free or uncomplexed label is a measure of the ability of the particular antibody to bind to the M-CSF or M-CSFR polypeptide

In another embodiment of the invention, high throughput screening for antibody fragments or CDRs having suitable binding affinity to a M-CSF polypeptide is employed. Briefly, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate. The peptide test antibodies are contacted with a M-CSF polypeptide and washed. Bound M-CSF polypeptides are then detected by methods well known in the art. Purified polypeptides of the invention can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. In addition, non-neutralizing antibodies can be used to capture the protein and immobilize it on the solid support.

Combination Therapy

Having identified more than one M-CSF antibody that is effective in an animal model, it may be further advantageous to mix two or more such M-CSF antibodies together to provide still improved efficacy against cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis. Compositions comprising one or more M-CSF antibody may be administered to persons or mammals suffering from, or predisposed to suffer from, cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis. Concurrent administration of two therapeutic agents does not require that the agents be administered at the same time or by the same route, as long as there is an overlap in the time period during which the agents are exerting their therapeutic effect. Simultaneous or sequential administration is contemplated, as is administration on different days or weeks.

Although M-CSF antibody therapy may be useful for all stages of cancers, antibody therapy may be particularly appropriate in advanced or metastatic cancers. Combining the antibody therapy method a chemotherapeutic or radiation regimen may be preferred in patients that have not received chemotherapeutic treatment, whereas treatment with the antibody therapy may be indicated for patients who have received one or more chemotherapies. Additionally, antibody therapy can also enable the use of reduced dosages of concomitant chemotherapy, particularly in patients that do not tolerate the toxicity of the chemotherapeutic agent very well.

The method of the invention contemplate the administration of single anti-M-CSF antibodies, as well as combinations, or "cocktails", of different antibodies. Such antibody cocktails may have certain advantages inasmuch as they contain antibodies which exploit different effector mechanisms or combine directly cytotoxic antibodies with antibodies that rely on immune effector functionality. Such antibodies in combination may

exhibit synergistic therapeutic effects.

Combining RX1 or Human Engineered™ derivative of RX1 antibody with other therapeutics can have an effect on a patient experiencing osteoclastic disease and/or tumor growth or metastasis. For example, one could use of RX1 antibody in the manufacture of a medicament for treating a patient having an osteolytic disease wherein said medicament is coordinated with treatment using an anti-RANKL antibody, soluble RANKL receptor, other RANKL inhibitors, or bisphosphonates (e.g., Aredia; Zometa; Clodronate). Alternatively, one could use an anti-RANKL antibody or bisphosphonate in the manufacture of a medicament for treating a for treating a patient having an osteolytic disease wherein said medicament coordinated with treatment using RX1 antibody or human engineered derivative of RX1 antibody. The combination might also have a synergistic effect in a treated patient. The RX1 antibody and other therapeutic need not be administered simultaneously. RX1 or the human engineered variant and the other therapeutic can administered within 1day, 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 2 months, 3 months, 6 months, 1 year or two years of each other.

The invention also contemplates the use of an RX1 antibody or a Human Engineered™ derivative of RX1 antibody in the manufacture of a medicament for treating a patient having an osteolytic disease wherein said medicament is used in a patient that has been pre-treated with an anti-RANKL antibody or bisphosphonates. "Pre-treatment" means that a patient had been treated treated within 2 years, 1 year, 6 months, 3 months 2 months, 1 month, 2 weeks, 1 week, or at least one day one before treatment with RX1 or Human Engineered™ variant of RX1.

RX1 antibody or Human Engineered™ variants can be used in combination with other cancer therapeutics. For example, one could use of RX1 antibody or human engineered variants in the manufacture of a medicament for treating a patient having cancer disease wherein said medicament is coordinated with treatment using other therapeutic agents and/or procedures, including but not limited to various chemotherapeutic agents, androgen-blockers, and immune modulators (e.g., IL-2, GM-CSF, SLC), Bisphosphonate(s) (e.g., Aredia; Zometa; Clodronate), surgery, radiation, cytotoxic chemotherapy, hormone therapy (e.g., Tamoxifen; anti-Androgen therapy), antibody therapy (e.g., antibodies to RANKL/RANK neutralizing; PTHrP neutralizing, anti-Her2, anti-CD20, anti-CD40, CD22, VEGF, IGFR-1, EphA2, HAAH, TMEFF2, CAIX antibodies), therapeutic protein therapy (e.g., soluble RANKL receptor; OPG, and PDGF and MMP inhibitors), small molecule drug therapy (e.g., Src-kinase inhibitor), kinase inhibitors of growth factor receptors, or RANKL

inhibitors, oligonucleotides therapy (e.g., RANKL or RANK or PTHrP Anti-sense), gene therapy (e.g., RANKL or RANK inhibitors), peptide therapy (e.g. muteins of RANKL) as well as those proteins, peptides, compounds, and small molecules described herein. .

RX1 and Human Engineered™ variants can be used in the manufacture of a medicament for treating patients that have been pretreated with the above mentioned therapeutics.

A cytotoxic agent refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (*e.g.*, I^{131}, I^{125}, Y^{90} and Re^{186}), chemotherapeutic agents, and toxins such as enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin or synthetic toxins, or fragments thereof. A non-cytotoxic agent refers to a substance that does not inhibit or prevent the function of cells and/or does not cause destruction of cells. A non-cytotoxic agent may include an agent that can be activated to be cytotoxic. A non-cytotoxic agent may include a bead, liposome, matrix or particle (*see, e.g.*, U.S. Patent Publications 2003/0028071 and 2003/0032995 which are incorporated by reference herein). Such agents may be conjugated, coupled, linked or associated with an antibody according to the invention.

Cancer chemotherapeutic agents include, without limitation, alkylating agents, such as carboplatin and cisplatin; nitrogen mustard alkylating agents; nitrosourea alkylating agents, such as carmustine (BCNU); antimetabolites, such as methotrexate; folinic acid; purine analog antimetabolites, mercaptopurine; pyrimidine analog antimetabolites, such as fluorouracil (5-FU) and gemcitabine (Gemzar®); hormonal antineoplastics, such as goserelin, leuprolide, and tamoxifen; natural antineoplastics, such as aldesleukin, interleukin-2, docetaxel, etoposide (VP-16), interferon alfa, paclitaxel (Taxol®), and tretinoin (ATRA); antibiotic natural antineoplastics, such as bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, daunomycin and mitomycins including mitomycin C; and vinca alkaloid natural antineoplastics, such as vinblastine, vincristine, vindesine; hydroxyurea; aceglatone, adriamycin, ifosfamide, enocitabine, epitiostanol, aclarubicin, ancitabine, nimustine, procarbazine hydrochloride, carboquone, carboplatin, carmofur, chromomycin A3, antitumor polysaccharides, antitumor platelet factors, cyclophosphamide (Cytoxin®), Schizophyllan, cytarabine (cytosine arabinoside), dacarbazine, thioinosine, thiotepa, tegafur, dolastatins, dolastatin analogs such as auristatin, CPT-11 (irinotecan), mitozantrone, vinorelbine, teniposide, aminopterin, carminomycin, esperamicins (See, e.g., U.S. Patent No. 4,675,187), neocarzinostatin, OK-432, bleomycin, furtulon, broxuridine, busulfan, honvan, peplomycin,

bestatin (Ubenimex®), interferon- β, mepitiostane, mitobronitol, melphalan, laminin peptides, lentinan, Coriolus versicolor extract, tegafur/uracil, estramustine (estrogen/mechlorethamine).

Further, additional agents used as therapy for cancer patients include EPO, G-CSF, ganciclovir; antibiotics, leuprolide; meperidine; zidovudine (AZT); interleukins 1 through 18, including mutants and analogues; interferons or cytokines, such as interferons α, β, and γ hormones, such as luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and analogues and, gonadotropin releasing hormone (GnRH); growth factors, such as transforming growth factor- β (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF), nerve growth factor (NGF), growth hormone releasing factor (GHRF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor homologous factor (FGFHF), hepatocyte growth factor (HGF), and insulin growth factor (IGF); tumor necrosis factor- α & β (TNF- α & β); invasion inhibiting factor-2 (IIF-2); bone morphogenetic proteins 1-7 (BMP 1-7); somatostatin; thymosin- α -1; γ-globulin; superoxide dismutase (SOD); complement factors; anti-angiogenesis factors; antigenic materials; and pro-drugs.

Prodrug refers to a precursor or derivative form of a pharmaceutically active substance that is less cytotoxic or non-cytotoxic to tumor cells compared to the parent drug and is capable of being enzymatically activated or converted into an active or the more active parent form. *See, e.g.*, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Prodrugs include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs, peptide-containing prodrugs, D-amino acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, β-lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or optionally substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs which can be converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic drugs that can be derivatized into a prodrug form for use herein include, but are not limited to, those chemotherapeutic agents described above.

Administration and preparation

The anti-M-CSF antibodies used in the practice of a method of the invention may be formulated into pharmaceutical compositions comprising a carrier suitable for the

desired delivery method. Suitable carriers include any material which, when combined with the anti-M-CSF antibodies, retains the anti-tumor function of the antibody and is nonreactive with the subject's immune systems. Examples include, but are not limited to, any of a number of standard pharmaceutical carriers such as sterile phosphate buffered saline solutions, bacteriostatic water, and the like. A variety of aqueous carriers may be used, e.g., water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine and the like, and may include other proteins for enhanced stability, such as albumin, lipoprotein, globulin, etc., subjected to mild chemical modifications or the like.

Therapeutic formulations of the antibody are prepared for storage by mixing the antibody having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.*, Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG).

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. For example, it may be desirable to further provide an immunosuppressive agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsule prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsule and poly-(methylmethacylate) microcapsule,

respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

The formulations to be used for in vivo administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

The antibody is administered by any suitable means, including parenteral, subcutaneous, intraperitoneal, intrapulmonary, and intranasal, and, if desired for local treatment, intralesional administration. Parenteral infusions include intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradermal or subcutaneous administration. In addition, the antibody is suitably administered by pulse infusion, particularly with declining doses of the antibody. Preferably the dosing is given by injections, most preferably intravenous or subcutaneous injections, depending in part on whether the administration is brief or chronic. Other administration methods are contemplated, including topical, particularly transdermal, transmucosal, rectal, oral or local administration e.g. through a catheter placed close to the desired site.

Compositions of the present invention can be in the form of, for example, granules, powders, tablets, capsules, syrup, suppositories, injections, emulsions, elixirs, suspensions or solutions. The instant compositions can be formulated for various routes of administration, for example, by oral administration, by nasal administration, by rectal administration, subcutaneous injection, intravenous injection, intramuscular injections, or intraperitoneal injection. The following dosage forms are given by way of example and should not be construed as limiting the instant invention.

For oral, buccal, and sublingual administration, powders, suspensions, granules, tablets, pills, capsules, gelcaps, and caplets are acceptable as solid dosage forms. These can be prepared, for example, by mixing one or more compounds of the instant invention, or pharmaceutically acceptable salts or tautomers thereof, with at least one additive such as a starch or other additive. Suitable additives are sucrose, lactose, cellulose sugar, mannitol, maltitol, dextran, starch, agar, alginates, chitins, chitosans, pectins, tragacanth gum, gum arabic, gelatins, collagens, casein, albumin, synthetic or semi-synthetic polymers or glycerides. Optionally, oral dosage forms can contain other ingredients to aid in administration, such as an inactive diluent, or lubricants such as magnesium stearate, or

preservatives such as paraben or sorbic acid, or anti-oxidants such as ascorbic acid, tocopherol or cysteine, a disintegrating agent, binders, thickeners, buffers, sweeteners, flavoring agents or perfuming agents. Tablets and pills may be further treated with suitable coating materials known in the art.

Liquid dosage forms for oral administration may be in the form of pharmaceutically acceptable emulsions, syrups, elixirs, suspensions, and solutions, which may contain an inactive diluent, such as water. Pharmaceutical formulations and medicaments may be prepared as liquid suspensions or solutions using a sterile liquid, such as, but not limited to, an oil, water, an alcohol, and combinations of these. Pharmaceutically suitable surfactants, suspending agents, emulsifying agents, may be added for oral or parenteral administration.

As noted above, suspensions may include oils. Such oil include, but are not limited to, peanut oil, sesame oil, cottonseed oil, corn oil and olive oil. Suspension preparation may also contain esters of fatty acids such as ethyl oleate, isopropyl myristate, fatty acid glycerides and acetylated fatty acid glycerides. Suspension formulations may include alcohols, such as, but not limited to, ethanol, isopropyl alcohol, hexadecyl alcohol, glycerol and propylene glycol. Ethers, such as but not limited to, poly(ethyleneglycol), petroleum hydrocarbons such as mineral oil and petrolatum; and water may also be used in suspension formulations.

For nasal administration, the pharmaceutical formulations and medicaments may be a spray or aerosol containing an appropriate solvent(s) and optionally other compounds such as, but not limited to, stabilizers, antimicrobial agents, antioxidants, pH modifiers, surfactants, bioavailability modifiers and combinations of these. A propellant for an aerosol formulation may include compressed air, nitrogen, carbon dioxide, or a hydrocarbon based low boiling solvent.

Injectable dosage forms generally include aqueous suspensions or oil suspensions which may be prepared using a suitable dispersant or wetting agent and a suspending agent. Injectable forms may be in solution phase or in the form of a suspension, which is prepared with a solvent or diluent. Acceptable solvents or vehicles include sterilized water, Ringer's solution, or an isotonic aqueous saline solution. Alternatively, sterile oils may be employed as solvents or suspending agents. Preferably, the oil or fatty acid is non-volatile, including natural or synthetic oils, fatty acids, mono-, di- or tri-glycerides.

47

For injection, the pharmaceutical formulation and/or medicament may be a powder suitable for reconstitution with an appropriate solution as described above. Examples of these include, but are not limited to, freeze dried, rotary dried or spray dried powders, amorphous powders, granules, precipitates, or particulates. For injection, the formulations may optionally contain stabilizers, pH modifiers, surfactants, bioavailability modifiers and combinations of these.

For rectal administration, the pharmaceutical formulations and medicaments may be in the form of a suppository, an ointment, an enema, a tablet or a cream for release of compound in the intestines, sigmoid flexure and/or rectum. Rectal suppositories are prepared by mixing one or more compounds of the instant invention, or pharmaceutically acceptable salts or tautomers of the compound, with acceptable vehicles, for example, cocoa butter or polyethylene glycol, which is present in a solid phase at normal storing temperatures, and present in a liquid phase at those temperatures suitable to release a drug inside the body, such as in the rectum. Oils may also be employed in the preparation of formulations of the soft gelatin type and suppositories. Water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions, and glycerols may be employed in the preparation of suspension formulations which may also contain suspending agents such as pectins, carbomers, methyl cellulose, hydroxypropyl cellulose or carboxymethyl cellulose, as well as buffers and preservatives.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.*, films, or microcapsule. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and y ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the Lupron Depot™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C., resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is

discovered to be intermolecular S--S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

The formulations of the invention may be designed to be short-acting, fast-releasing, long-acting, or sustained-releasing as described herein. Thus, the pharmaceutical formulations may also be formulated for controlled release or for slow release.

The instant compositions may also comprise, for example, micelles or liposomes, or some other encapsulated form, or may be administered in an extended release form to provide a prolonged storage and/or delivery effect. Therefore, the pharmaceutical formulations and medicaments may be compressed into pellets or cylinders and implanted intramuscularly or subcutaneously as depot injections or as implants such as stents. Such implants may employ known inert materials such as silicones and biodegradable polymers.

Besides those representative dosage forms described above, pharmaceutically acceptable excipients and carries are generally known to those skilled in the art and are thus included in the instant invention. Such excipients and carriers are described, for example, in "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991), which is incorporated herein by reference.

Specific dosages may be adjusted depending on conditions of disease, the age, body weight, general health conditions, sex, and diet of the subject, dose intervals, administration routes, excretion rate, and combinations of drugs. Any of the above dosage forms containing effective amounts are well within the bounds of routine experimentation and therefore, well within the scope of the instant invention.

M-CSF antibodies useful as therapeutics for cancer metastasis or bone loss associated with cancer metastasis will often be prepared substantially free of other naturally occurring immunoglobulins or other biological molecules. Preferred M-CSF antibodies will also exhibit minimal toxicity when administered to a mammal afflicted with, or predisposed to suffer from, cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis.

The compositions of the invention may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. The resulting solutions may be packaged for use or filtered under aseptic conditions and lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile solution prior to administration. The compositions may contain pharmaceutically

acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as pH adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride and stabilizers (e.g., 1 20% maltose, etc.).

The M-CSF antibodies of the present invention may also be administered via liposomes, which are small vesicles composed of various types of lipids and/or phospholipids and/or surfactant which are useful for delivery of a drug (such as the antibodies disclosed herein and, optionally, a chemotherapeutic agent). Liposomes include emulsions, foams, micelles, insoluble monolayers, phospholipid dispersions, lamellar layers and the like, and can serve as vehicles to target the M-CSF antibodies to a particular tissue as well as to increase the half life of the composition. A variety of methods are available for preparing liposomes, as described in, e.g., U.S. Patent Nos. 4,837,028 and 5,019,369, which patents are incorporated herein by reference.

Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); and U.S. Patent Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556. Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) via a disulfide interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome [*see, e.g.*, Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989)].

The concentration of the M-CSF antibody in these compositions can vary widely, i.e., from less than about 10%, usually at least about 25% to as much as 75% or 90% by weight and will be selected primarily by fluid volumes, viscosities, etc., in accordance with the particular mode of administration selected. Actual methods for preparing orally, topically and parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in detail in, for example, Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995), which is incorporated herein by reference.

Determination of an effective amount of a composition of the invention to treat cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis in a patient can be accomplished through standard empirical methods which are well known in the art. For example, the in vivo neutralizing activity of sera from a subject treated with a given dosage of M-CSF antibody may be evaluated using an assay that determines the ability of the sera to block M-CSF induced proliferation and survival of murine monocytes (CD11b+ cell, a subset of CD11 cells, which expresses high levels of receptor to M-CSF) in vitro as described in Cenci et al., J Clin. Invest. 1055: 1279-87, 2000.

Compositions of the invention are administered to a mammal already suffering from, or predisposed to, cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis in an amount sufficient to prevent or at least partially arrest the development of cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective dose." Effective amounts of a M-CSF antibody will vary and depend on the severity of the disease and the weight and general state of the patient being treated, but generally range from about 1.0 μg/kg to about 100 mg/kg body weight, or about 10 μg/kg to about 30 mg/kg, with dosages of from about 0.1 mg/kg to about 10 mg/kg or about 1 mg/kg to about 10 mg/kg per application being more commonly used. For example, about 10 μg/kg to 5 mg/kg or about 30 μg/kg to 1 mg/kg of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. Administration is daily, on alternating days, weekly or less frequently, as necessary depending on the response to the disease and the patient's tolerance of the therapy. Maintenance dosages over a longer period of time, such as 4, 5, 6, 7, 8, 10 or 12 weeks or longer may be needed until a desired suppression of disease symptoms occurs, and dosages may be adjusted as necessary. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

Single or multiple administrations of the compositions can be carried out with the dose levels and pattern being selected by the treating physician. For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of antibody will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

In any event, the formulations should provide a quantity of M-CSF antibody

over time that is sufficient to effectively prevent or minimize the severity of cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis. The compositions of the present invention may be administered alone or as an adjunct therapy in conjunction with other therapeutics known in the art for the treatment of cancer metastasis and/or bone loss associated with cancer metastasis.

The antibody composition will be formulated, dosed, and administered in a fashion consistent with good medical practice. Factors for consideration in this context include the particular disorder being treated, the particular mammal being treated, the clinical condition of the individual patient, the cause of the disorder, the site of delivery of the agent, the method of administration, the scheduling of administration, and other factors known to medical practitioners. The therapeutically effective amount of the antibody to be administered will be governed by such considerations, and is the minimum amount necessary to prevent, ameliorate, or treat the M-CSF mediated disease, condition or disorder, particularly to treat cancer cells, and most particularly to treat tumor cell metastases. Such amount is preferably below the amount that is toxic to the host or renders the host significantly more susceptible to infections.

The antibody need not be, but is optionally formulated with one or more agents currently used to prevent or treat the disorder in question. For example, in cancer, the antibody may be given in conjunction with chemo therapeutic agent or in ADEPT as described above. The effective amount of such other agents depends on the amount of antibody present in the formulation, the type of disease, condition or disorder or treatment, and other factors discussed above. These are generally used in the same dosages and with administration routes as used hereinbefore or about from 1 to 99% of the heretofore employed dosages.

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment of the diseases, disorders or conditions described above is provided, including for treatment of cancer. The article of manufacture comprises a container and a label. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, and test tubes. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for treating the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The active agent in the composition is the antibody of the invention. The label on, or associated with, the container

indicates that the composition is used for treating the condition of choice. The article of manufacture may further comprise a second container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, syringes, and package inserts with instructions for use.

Immunotherapy

Anti-M-CSF antibodies useful in treating patients having cancers include those which are capable of initiating a potent immune response against the tumor and those which are capable of direct cytotoxicity. In this regard, anti-M-CSF antibodies may elicit tumor cell lysis by either complement-mediated or antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) mechanisms, both of which require an intact Fc portion of the immunoglobulin molecule for interaction with effector cell Fc receptor sites or complement proteins. In addition, anti-M-CSF antibodies that exert a direct biological effect on tumor growth are useful in the practice of the invention. Potential mechanisms by which such directly cytotoxic antibodies may act include inhibition of cell growth, modulation of cellular differentiation, modulation of tumor angiogenesis factor profiles, and the induction of apoptosis. The mechanism by which a particular anti-M-CSF antibody exerts an anti-tumor effect may be evaluated using any number of *in vitro* assays designed to determine ADCC, ADMMC, complement-mediated cell lysis, and so forth, as is generally known in the art.

In one embodiment, immunotherapy is carried out using antibodies that have a higher affinity for the membrane-bound form of M-CSF (M-CSFα) than for the secreted forms of M-CSF. For example, antibodies may be prepared that specifically bind at or around the cleavage site of M-CSFα or to the portion of M-CSFα adjacent to the membrane. Such antibodies may also beneficially inhibit cleavage and release of the soluble active portion of M-CSFα.

The anti-M-CSF antibodies may be administered in their "naked" or unconjugated form, or may have therapeutic agents conjugated to them. In one embodiment, anti-M-CSF antibodies are used as a radiosensitizer. In such embodiments, the anti-M-CSF antibodies are conjugated to a radiosensitizing agent. The term "radiosensitizer," as used herein, is defined as a molecule, preferably a low molecular weight molecule, administered to animals in therapeutically effective amounts to increase the sensitivity of the cells to be

radiosensitized to electromagnetic radiation and/or to promote the treatment of diseases that are treatable with electromagnetic radiation. Diseases that are treatable with electromagnetic radiation include neoplastic diseases, benign and malignant tumors, and cancerous cells.

The terms "electromagnetic radiation" and "radiation" as used herein include, but are not limited to, radiation having the wavelength of 10^{-20} to 100 meters. Preferred embodiments of the present invention employ the electromagnetic radiation of: gamma-radiation (10^{-20} to 10^{-13} m), X-ray radiation (10^{-12} to 10^{-9} m), ultraviolet light (10 nm to 400 nm), visible light (400 nm to 700 nm), infrared radiation (700 nm to 1.0 mm), and microwave radiation (1 mm to 30 cm).

Radiosensitizers are known to increase the sensitivity of cancerous cells to the toxic effects of electromagnetic radiation. Many cancer treatment protocols currently employ radiosensitizers activated by the electromagnetic radiation of X-rays. Examples of X-ray activated radiosensitizers include, but are not limited to, the following: metronidazole, misonidazole, desmethylmisonidazole, pimonidazole, etanidazole, nimorazole, mitomycin C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nicotinamide, 5-bromodeoxyuridine (BUdR), 5-iododeoxyuridine (IUdR), bromodeoxycytidine, fluorodeoxyuridine (FUdR), hydroxyurea, cisplatin, and therapeutically effective analogs and derivatives of the same.

Photodynamic therapy (PDT) of cancers employs visible light as the radiation activator of the sensitizing agent. Examples of photodynamic radiosensitizers include the following, but are not limited to: hematoporphyrin derivatives, Photofrin(r), benzoporphyrin derivatives, NPe6, tin etioporphyrin (SnET2), pheoborbide-a, bacteriochlorophyll-a, naphthalocyanines, phthalocyanines, zinc phthalocyanine, and therapeutically effective analogs and derivatives of the same.

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a receptor (such streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a ligand (*e.g.*, avidin) which is conjugated to a cytotoxic agent (*e.g.*, a radionuclide).

The present invention further provides the above-described antibodies in detectably labeled form. Antibodies can be detectably labeled through the use of radioisotopes, affinity labels (such as biotin, avidin, etc.), enzymatic labels (such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, etc.) fluorescent or luminescent or

bioluminescent labels (such as FITC or rhodamine, etc.), paramagnetic atoms, and the like. Procedures for accomplishing such labeling are well known in the art; for example, see (Sternberger, L.A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

"Label" refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody. The label may itself be detectable by itself (*e.g.*, radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable. Alternatively, the label may not be detectable on its own but may be an element that is bound by another agent that is detectable (e.g. an epitope tag or one of a binding partner pair such as biotin-avidin, etc.) Thus, the antibody may comprise a label or tag that facilitates its isolation, and methods of the invention to identify antibodies include a step of isolating the M-CSF /antibody through interaction with the label or tag.

Exemplary therapeutic immunoconjugates comprise the antibody described herein conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate). Fusion proteins are described in further detail below.

Production of immunconjugates is described in U.S. Patent No. 6,306,393. Immnunoconjugates can be prepared by indirectly conjugating a therapeutic agent to an antibody component. General techniques are described in Shih et al., Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); and Shih et al., U.S. Pat. No. 5,057,313. The general method involves reacting an antibody component having an oxidized carbohydrate portion with a carrier polymer that has at least one free amine function and that is loaded with a plurality of drug, toxin, chelator, boron addends, or other therapeutic agent. This reaction results in an initial Schiff base (imine) linkage, which can be stabilized by reduction to a secondary amine to form the final conjugate.

The carrier polymer is preferably an aminodextran or polypeptide of at least 50 amino acid residues, although other substantially equivalent polymer carriers can also be used. Preferably, the final immunoconjugate is soluble in an aqueous solution, such as mammalian serum, for ease of administration and effective targeting for use in therapy.

51

Thus, solubilizing functions on the carrier polymer will enhance the serum solubility of the final immunoconjugate. In particular, an aminodextran will be preferred.

The process for preparing an inmmunoconjugate with an aminodextran carrier typically begins with a dextran polymer, advantageously a dextran of average molecular weight of about 10,000-100,000. The dextran is reacted with an oxidizing agent to affect a controlled oxidation of a portion of its carbohydrate rings to generate aldehyde groups. The oxidation is conveniently effected with glycolytic chemical reagents such as $NaIO_4$, according to conventional procedures.

The oxidized dextran is then reacted with a polyamine, preferably a diamine, and more preferably, a mono- or polyhydroxy diamine. Suitable amines include ethylene diamine, propylene diamine, or other like polymethylene diamines, diethylene triamine or like polyamines, 1,3-diamino-2-hydroxypropane, or other like hydroxylated diamines or polyamines, and the like. An excess of the amine relative to the aldehyde groups of the dextran is used to ensure substantially complete conversion of the aldehyde functions to Schiff base groups.

A reducing agent, such as $NaBH_4$, $NaBH_3$ CN or the like, is used to effect reductive stabilization of the resultant Schiff base intermediate. The resultant adduct can be purified by passage through a conventional sizing column to remove cross-linked dextrans.

Other conventional methods of derivatizing a dextran to introduce amine functions can also be used, e.g., reaction with cyanogen bromide, followed by reaction with a diamine.

The amninodextran is then reacted with a derivative of the particular drug, toxin, chelator, immunomodulator, boron addend, or other therapeutic agent to be loaded, in an activated form, preferably, a carboxyl-activated derivative, prepared by conventional means, *e.g.*, using dicyclohexylcarbodiimide (DCC) or a water soluble variant thereof, to form an intermediate adduct.

Alternatively, polypeptide toxins such as pokeweed antiviral protein or ricin A-chain, and the like, can be coupled to aminodextran by glutaraldehyde condensation or by reaction of activated carboxyl groups on the protein with amines on the aminodextran.

Chelators for radiometals or magnetic resonance enhancers are well-known in the art. Typical are derivatives of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). These chelators typically have groups on the

side chain by which the chelator can be attached to a carrier. Such groups include, *e.g.*, benzylisothiocyanate, by which the DTPA or EDTA can be coupled to the amine group of a carrier. Alternatively, carboxyl groups or amine groups on a chelator can be coupled to a carrier by activation or prior derivatization and then coupling, all by well-known means.

Boron addends, such as carboranes, can be attached to antibody components by conventional methods. For example, carboranes can be prepared with carboxyl functions on pendant side chains, as is well known in the art. Attachment of such carboranes to a carrier, e.g., aminodextran, can be achieved by activation of the carboxyl groups of the carboranes and condensation with amines on the carrier to produce an intermediate conjugate. Such intermediate conjugates are then attached to antibody components to produce therapeutically useful immunoconjugates, as described below.

A polypeptide carrier can be used instead of aminodextran, but the polypeptide carrier should have at least 50 amino acid residues in the chain, preferably 100-5000 amino acid residues. At least some of the amino acids should be lysine residues or glutamate or aspartate residues. The pendant amines of lysine residues and pendant carboxylates of glutamine and aspartate are convenient for attaching a drug, toxin, immunomodulator, chelator, boron addend or other therapeutic agent. Examples of suitable polypeptide carriers include polylysine, polyglutamic acid, polyaspartic acid, co-polymers thereof, and mixed polymers of these amino acids and others, e.g., serines, to confer desirable solubility properties on the resultant loaded carrier and immunoconjugate.

Conjugation of the intermediate conjugate with the antibody component is effected by oxidizing the carbohydrate portion of the antibody component and reacting the resulting aldehyde (and ketone) carbonyls with amine groups remaining on the carrier after loading with a drug, toxin, chelator, immunomodulator, boron addend, or other therapeutic agent. Alternatively, an intermediate conjugate can be attached to an oxidized antibody component via amine groups that have been introduced in the intermediate conjugate after loading with the therapeutic agent. Oxidation is conveniently effected either chemically, e.g., with $NaIO_4$ or other glycolytic reagent, or enzymatically, *e.g.*, with neuraminidase and galactose oxidase. In the case of an aminodextran carrier, not all of the amines of the aminodextran are typically used for loading a therapeutic agent. The remaining amines of aminodextran condense with the oxidized antibody component to form Schiff base adducts, which are then reductively stabilized, normally with a borohydride reducing agent.

52

Analogous procedures are used to produce other immunoconjugates according to the invention. Loaded polypeptide carriers preferably have free lysine residues remaining for condensation with the oxidized carbohydrate portion of an antibody component. Carboxyls on the polypeptide carrier can, if necessary, be converted to amines by, e.g., activation with DCC and reaction with an excess of a diamme.

The final immunoconjugate is purified using conventional techniques, such as sizing chromatography on Sephacryl S-300 or affinity chromatography using one or more CD84Hy epitopes.

Alternatively, immunoconjugates can be prepared by directly conjugating an antibody component with a therapeutic agent. The general procedure is analogous to the indirect method of conjugation except that a therapeutic agent is directly attached to an oxidized antibody component.

It will be appreciated that other therapeutic agents can be substituted for the chelators described herein. Those of skill in the art will be able to devise conjugation schemes without undue experimentation.

As a further illustration, a therapeutic agent can be attached at the hinge region of a reduced antibody component via disulfide bond formation. For example, the tetanus toxoid peptides can be constructed with a single cysteine residue that is used to attach the peptide to an antibody component. As an alternative, such peptides can be attached to the antibody component using a heterobifunctional cross-linker, such as N-succinyl 3-(2-pyridyldithio)proprionate (SPDP). Yu et al., Int. J. Cancer56:244 (1994). General techniques for such conjugation are well-known in the art. See, for example, Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upeslacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Enineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995).

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as

glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclide to the antibody (*see, e.g.,* WO94/11026).

As described above, carbohydrate moieties in the Fc region of an antibody can be used to conjugate a therapeutic agent. However, the Fc region may be absent if an antibody fragment is used as the antibody component of the immunoconjugate. Nevertheless, it is possible to introduce a carbohydrate moiety into the light chain variable region of an antibody or antibody fragment. See, for example, Leung et al., J. Immunol. 154:5919 (1995); Hansen et al., U.S. Pat. No. 5,443,953. The engineered carbohydrate moiety is then used to attach a therapeutic agent.

In addition, those of skill in the art will recognize numerous possible variations of the conjugation methods. For example, the carbohydrate moiety can be used to attach polyethyleneglycol in order to extend the half-life of an intact antibody, or antigen-binding fragment thereof, in blood, lymph, or other extracellular fluids. Moreover, it is possible to construct a "divalent immunoconjugate" by attaching therapeutic agents to a carbohydrate moiety and to a free sulfhydryl group. Such a free sulfhydryl group may be located in the hinge region of the antibody component.

Anti-M-CSF Antibody Fusion Proteins

The present invention contemplates the use of fusion proteins comprising one or more anti-M-CSF antibody moieties and an immunomodulator or toxin moiety. Methods of making antibody fusion proteins are well known in the art. See, *e.g.*, U.S. Patent No. 6,306,393. Antibody fusion proteins comprising an interleukin-2 moiety are described by Boleti et al., Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet et al., Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank et al., Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), and Hu et al., Cancer Res. 56:4998 (1996). In addition, Yang et al., Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995), describe a fusion protein that includes an $F(ab')_2$ fragment and a tumor necrosis factor alpha moiety.

Methods of making antibody-toxin fusion proteins in which a recombinant

molecule comprises one or more antibody components and a toxin or chemotherapeutic agent also are known to those of skill in the art. For example, antibody-*Pseudomonas* exotoxin A fusion proteins have been described by Chaudhary et al., Nature 339:394 (1989), Brinkmann et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman et al., J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels et al., Int. J. Can. 60:137 (1995), Fominaya et al., J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan et al., Biochemistry 35:2872 (1996), and Schmidt et al., Int. J. Can. 65:538 (1996). Antibody-toxin fusion proteins containing a diphtheria toxin moiety have been described by Kreitman et al., Leukemia 7:553 (1993), Nicholls et al., J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson et al., J. Biol. Chem. 270:28037 (1995), and Vallera et al., Blood 88:2342 (1996). Deonarain et al., Tumor Targeting 1:177 (1995), have described an antibody-toxin fusion protein having an RNase moiety, while Linardou et al., Cell Biophys. 24-25:243 (1994), produced an antibody-toxin fusion protein comprising a DNase I component. Gelonin was used as the toxin moiety in the antibody-toxin fusion protein of Wang et al., Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005. As a further example, Dohlsten et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994), reported an antibody-toxin fusion protein comprising *Staphylococcal* enterotoxin-A.

Illustrative of toxins which are suitably employed in the preparation of such conjugates are ricin, abrin, ribonuclease, DNase I, Staphylococcal enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtherin toxin, Pseudomonas exotoxin, and Pseudomonas endotoxin. See, for example, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), and Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Other suitable toxins are known to those of skill in the art.

Antibodies of the present invention may also be used in ADEPT by conjugating the antibody to a prodrug-activating enzyme which converts a prodrug (*e.g.*, a peptidyl chemotherapeutic agent, *See* WO81/01145) to an active anti-cancer drug. *See*, for example, WO88/07378 and U.S. Patent No. 4,975,278.

The enzyme component of the immunoconjugate useful for ADEPT includes any enzyme capable of acting on a prodrug in such a way so as to covert it into its more active, cytotoxic form.

Enzymes that are useful in the method of this invention include, but are not limited to, alkaline phosphatase useful for converting phosphate-containing prodrugs into free

drugs; arylsulfatase useful for converting sulfate-containing prodrugs into free drugs; cytosine deaminase useful for converting non-toxic 5-fluorocytosine into the anti-cancer drug, 5-fluorouracil; proteases, such as serratia protease, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidases and cathepsins (such as cathepsins B and L), that are useful for converting peptide-containing prodrugs into free drugs; D-alanylcarboxypeptidases, useful for converting prodrugs that contain D-amino acid substituents; carbohydrate-cleaving enzymes such as β-galactosidase and neuraminidase useful for converting glycosylated prodrugs into free drugs; β-lactamase useful for converting drugs derivatized with β-lactams into free drugs; and penicillin amidases, such as penicillin V amidase or penicillin G amidase, useful for converting drugs derivatized at their amine nitrogens with phenoxyacetyl or phenylacetyl groups, respectively, into free drugs. Alternatively, antibodies with enzymatic activity, also known in the art as abzymes, can be used to convert the prodrugs of the invention into free active drugs (*See, e.g.*, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Antibody-abzyme conjugates can be prepared as described herein for delivery of the abzyme to a tumor cell population.

The enzymes of this invention can be covalently bound to the antibodies by techniques well known in the art such as the use of the heterobifunctional crosslinking reagents discussed above. Alternatively, fusion proteins comprising at least the antigen binding region of an antibody of the invention linked to at least a functionally active portion of an enzyme of the invention can be constructed using recombinant DNA techniques well known in the art (*See, e.g.*, Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984))

Non-therapeutic uses

The antibodies of the invention may be used as affinity purification agents for M-CSF or in diagnostic assays for M-CSF protein, *e.g.*, detecting its expression in specific cells, tissues, or serum. The antibodies may also be used for in vivo diagnostic assays. Generally, for these purposes the antibody is labeled with a radionuclide (such as ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{125}I, ^{3}H, ^{32}P or ^{35}S) so that the tumor can be localized using immunoscintiography.

The antibodies of the present invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, such as ELISAs, and immunoprecipitation assays. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987). The antibodies may also be used for immunohistochemistry, to label tumor samples using methods known in the art.

As a matter of convenience, the antibody of the present invention can be

provided in a kit, i.e., a packaged combination of reagents in predetermined amounts with instructions for performing the diagnostic assay. Where the antibody is labeled with an enzyme, the kit will include substrates and cofactors required by the enzyme (*e.g.*, a substrate precursor which provides the detectable chromophore or fluorophore). In addition, other additives may be included such as stabilizers, buffers (*e.g.*, a block buffer or lysis buffer) and the like. The relative amounts of the various reagents may be varied widely to provide for concentrations in solution of the reagents which substantially optimize the sensitivity of the assay. Particularly, the reagents may be provided as dry powders, usually lyophilized, including excipients which on dissolution will provide a reagent solution having the appropriate concentration.

The invention is illustrated by the following examples, which are not intended to be limiting in any way.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

This example shows that M-CSF antibodies RX1 and 5A1 are species specific and that antibodies RX1, MC1, and MC3 neutralize human M-CSF activity. RX1 is a commercially sold antibody that was available more than a year prior to the filing date of this application. Exemplary commercial sources include, but are not limited to, mouse anti-human M-CSF monoclonal antibody clones 116, 692, and 21 (Anogen); anti-human M-CSF antibody clones 21113.131, 26730, and 26786 (R & D Systems, Inc.); and anti-human M-CSF antibodyclone M16 (Antigenix America, Inc.).

To test the neutralizing activity of RX1 and 5A1, a proliferation assay of M-NFS-60 cell line was used (American Type Culture Collection Accession No. CRL-1838, available from ATCC in Rockville, MD, USA, derived from a myelogenous leukemia induced with the Cas-Br-MuLV wild mouse ecotropic retrovirous, responsive to both interleukin 3 and M-CSF and which contain a truncated c-myb proto-oncogene caused by the integration of a retrovirus). Proliferation of M-NFS-60 requires active M-CSF in a dose-dependent fashion. In the assay, M-NFS-60 cells were washed and plated in RPMI 1640 medium with 10% FBS and 3000 U/ml of M-CSF and 1% Pen/Strep. Recombinant human M-CSF (at 10 ng/ml final concentration), human or murine-specific, was incubated with various concentrations of antibodies for 1 hour at 37°C in 5% CO_2 in an incubator.

Following the incubation, the mixture was added to the M-NFS-60 culture in 96 well microtiter plates. The total assay volume per well was 100µl, with 10 ng/ml M-CSF, and the antibody concentration indicated in Figure 5. Cells were incubated at 37°C under 5% CO_2 for 72 hours before cell numbers were quantified by CellTiter Glo assay (Promega). The aforementioned assay was repeated for antibodies MC3 and MC1.

As shown in Figure 5, M-CSF antibodies RX1 and 5A1 are species specific. Cell proliferation is presented as the fluorescent reading from CellTiter Glo assay, which is linear with cell number. Species specific neutralizing activity of RX1 and 5A1 is shown by its ability to inhibit M-NFS-60 in the presence of either human or murine M-CSF. Finally, as shown in Figure 5B, antibodies MC3 and MC1 are also effective inhibitors of M-CSF activity.

EXAMPLE 2

This example shows that antibody RX1 effectively inhibits osteolysis in a human xenograft model at a dose of 5mg/kg. Female nude mice at the age of 4-7 weeks old, average weight ~20g were used in this study. Tumor cells (MDA-MB-231, $3x10^5$) suspended in 10µl of saline was be injected into the right tibia bone marrow cavity. Radiograms of the hind legs were taken one day after tumor inoculation for getting baseline image and checking for bone fracture caused by injection. Mice were randomized into treatment groups at 10 mice per group including PBS and RX1 at 5 mg/kg, injected i.p. once a week for 6 weeks. At the end of study, radiograms of the hind legs were taken again and compared against baseline for bone damage. The degree of bone damage caused by tumor was defined as shown in Figure 6. The group with RX1 5 mg/kg treatment showed statistically significant protection of the bone from tumor-cased damage.

EXAMPLE 3

This example shows that the number of metastases is reduced when antibody RX1 is administered to human breast cancer MDA-MB-231 bearing nude mice at a concentration of 5 mg/kg.

Female nude mice at the age of 4-7 weeks old, average weight ~20g were used for this study. Tumor cells (MDA-MB-231, $3x10^5$) suspended in 10µl of saline was injected

into the right tibia bone marrow cavity. Radiograms of the hind legs were taken one day after tumor inoculation for getting baseline image and checking for bone fracture caused by injection. Mice were randomly grouped into the treatment groups including PBS and RX1 at 5 mg/kg injected i.p. once a week for 6 weeks. At the end of study, lungs of each treatment group were collected and fixed in Bouin's solution for metastatic lung nodule counting.

As shown in Figure 7, that the number of metastases is reduced when antibody RX1 is administered to human breast cancer MDA-MB-231 bearing nude mice at a dose of 5 mg/kg.

EXAMPLE 4

This example sets out a procedure for humanization of the RX1 antibody. 5H4, MC1 and MC3 are humanized using similar procedures.

Design of genes for humanized RX1 light and heavy chains

The nucleotide and amino acid sequence for murine RX1 are set forth in Figure 4B. The sequence of a human antibody identified using the National Biomedical Foundation Protein Identification Resource or similar database is used to provide the framework of the humanized antibody. To select the sequence of the humanized heavy chain, the murine RX1 heavy chain sequence is aligned with the sequence of the human antibody heavy chain. At each position, the human antibody amino acid is selected for the humanized sequence, unless that position falls in any one of four categories defined below, in which case the murine RX1 amino acid is selected:

(1) The position falls within a complementarity determining region (CDR), as defined by Kabat, J. Immunol., 125, 961-969 (1980);

(2) The human antibody amino acid is rare for human heavy chains at that position, whereas the murine RX1 amino acid is common for human heavy chains at that position;

(3) The position is immediately adjacent to a CDR in the amino acid sequence of the murine RX1 heavy chain; or

(4) 3-dimensional modeling of the murine RX1 antibody suggests that the amino acid is physically close to the antigen binding region.

To select the sequence of the humanized light chain, the murine RX1 light chain sequence is aligned with the sequence of the human antibody light chain. The human antibody amino acid is selected at each position for the humanized sequence, unless the position again falls into one of the categories described above and repeated below:

(1) CDR's;

(2) murine RX1 amino acid more typical than human antibody;

(3) Adjacent to CDR's; or

(4) Possible 3-dimensional proximity to binding region.

The actual nucleotide sequence of the heavy and light chain genes is selected as follows:

(1) The nucleotide sequences code for the amino acid sequences chosen as described above;

(2) 5' of these coding sequences, the nucleotide sequences code for a leader (signal) sequence. These leader sequences were chosen as typical of antibodies;

(3) 3' of the coding sequences, the nucleotide sequences are the sequences that follow the mouse light chain J5 segment and the mouse heavy chain J2 segment, which are part of the murine RX1 sequence. These sequences are included because they contain splice donor signals; and

(4) At each end of the sequence is an Xba I site to allow cutting at the Xba I sites and cloning into the Xba I site of a vector.

Construction of humanized light and heavy chain genes

To synthesize the heavy chain, four oligonucleotides are synthesized using an Applied Biosystems 380B DNA synthesizer. Two of the oligonucleotides are part of each strand of the heavy chain, and each oligonucleotide overlaps the next one by about 20 nucleotides to allow annealing. Together, the oligonucleotides cover the entire humanized heavy chain variable region with a few extra nucleotides at each end to allow cutting at the Xba I sites. The oligonucleotides are purified from polyacrylamide gels.

Each oligonucleotide is phosphorylated using ATP and T4 polynucleotide kinase by standard procedures (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). To anneal the

phosphorylated oligonucleotides, they are suspended together in 40 ul of TA (33 mM Tris acetate, pH 7.9, 66 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate) at a concentration of about 3.75 uM each, heated to 95 °C. for 4 min. and cooled slowly to 4 °C. To synthesize the complete gene from the oligonucleotides by synthesizing the opposite strand of each oligonucleotide, the following components are added in a final volume of 100 ul:

10 ul	annealed oligonucleotides
0.16 mM	each deoxyribonucleotide
0.5 mM	ATP
0.5 mM	DTT
100 ug/ml	BSA
3.5 ug/ml	T4 g43 protein (DNA polymerase)
25 ug/ml	T4 g44/62 protein (polymerase accessory protein)
25 ug/ml	45 protein (polymerase accessory protein)

The mixture is incubated at 37 °C for 30 min. Then 10 u of T4 DNA ligase is added and incubation at 37 °C is resumed for 30 min. The polymerase and ligase are inactivated by incubation of the reaction at 70 °C for 15 min. To digest the gene with Xba I, 50 ul of 2 X TA containing BSA at 200 ug/ml and DTT at 1 mM, 43 ul of water, and 50 u of Xba I in 5 ul is added to the reaction. The reaction is incubated for 3 hr at 37 °C, and then purified on a gel. The Xba I fragment is purified from a gel and cloned into the Xba I site of the plasmid pUC19 by standard methods. Plasmids are purified using standard techniques and sequenced using the dideoxy method.

Construction of plasmids to express humanized light and heavy chains is accomplished by isolating the light and heavy chain Xba I fragments from the pUC19 plasmid in which it had been inserted and then inserting it into the Xba I site of an appropriate expression vector which will express high levels of a complete heavy chain when transfected into an appropriate host cell.

Synthesis and affinity of humanized antibody

The expression vectors are transfected into mouse Sp2/0 cells, and cells that integrate the plasmids are selected on the basis of the selectable marker(s) conferred by the expression vectors by standard methods. To verify that these cells secreted antibody that binds to M-CSF, supernatant from the cells are incubated with cells that are known to express M-CSF. After washing, the cells are incubated with fluorescein-conjugated goat anti-human antibody, washed, and analyzed for fluorescence on a FACSCAN cytofluorometer.

For the next experiments, cells producing the humanized antibody are injected into mice, and the resultant ascites is collected. Humanized antibody is purified to substantial homogeneity from the ascites by passage through an affinity column of goat anti-human immunoglobulin antibody, prepared on an Affigel-10 support (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, Calif.) according to standard techniques. To determine the affinity of the humanized antibody relative to the original murine RX1 antibody, a competitive binding experiment is performed according to techniques known in the art.

EXAMPLE 4A

This example describes cloning and expression of Human Engineered™ RX1 antibodies, as well as purification of such antibodies and testing for binding activity. Human Engineered™ 5H4, MC1, and MC3 antibodies are prepared using similar procedures.

Design of Human Engineered™ sequences

Human Engineering™ of antibody variable domains has been described by Studnicka [See, e.g., Studnicka et al. U.S. Patent No. 5,766,886; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] as a method for reducing immunogenicity while maintaining binding activity of antibody molecules. According to the method, each variable region amino acid has been assigned a risk of substitution. Amino acid substitutions are distinguished by one of three risk categories : (1) low risk changes are those that have the greatest potential for reducing immunogenicity with the least chance of disrupting antigen binding; (2) moderate risk changes are those that would further reduce immunogenicity, but have a greater chance of affecting antigen binding or protein folding; (3) high risk residues are those that are important for binding or for maintaining antibody structure and carry the highest risk that antigen binding or protein folding will be affected. Due to the three-dimensional structural role of prolines, modifications at prolines are generally considered to be at least moderate risk changes, even if the position is typically a low risk position. Subtitutional changes are preferred but insertions and deletions are also possible. Figures 4B and 4C show the risk assignment for each amino acid residue of murine RX1 light and heavy chains, respectively, categorized as a high, moderate or low risk change.

Variable regions of the light and heavy chains of the murine RX1 antibody were Human Engineered™ using this method. Amino acid residues that are candidates for modification according to the method at low risk positions were identified by aligning the

amino acid sequences of the murine variable regions with a human variable region sequence. Any human variable region can be used, including an individual VH or VL sequence or a human consensus VH or VL sequence. The amino acid residues at any number of the low risk positions, or at all of the low risk positions, can be changed. For the Human Engineered™ "low risk" heavy chain sequence in Figures 19A-B, human consensus Vh2 (based on Kabat) was used as the template, and for each position where the murine and human amino acid residues differed at low risk positions, an amino acid modification was introduced that replaced the murine residue with the human residue. For the Human Engineered™ "low risk" light chain sequence in Figures 20A-B, human consensus kappa 3 (based on Kabat) was used as the template, and for each position where the murine and human amino acid residues differed at low risk positions, an amino acid modification was introduced that replaced the murine residue with the human residue. A total of 16 amino acid low risk modifications were made to the light chain and 8 low risk modifications were made to the heavy chain.

Similarly, amino acid residues that are candidates for modification according to the method at all of the low and moderate risk positions were identified by aligning the amino acid sequences of the murine variable regions with a human variable region sequence. The amino acid residues at any number of the low or moderate risk positions, or at all of the low and moderate risk positions, can be changed. For the Human Engineered™ heavy chain sequence in Figures 19A-B, human consensus Vh2 (based on Kabat) was used as the template, and for each position where the murine and human amino acid residues differed at low or moderate risk positions, an amino acid modification was introduced that replaced the murine residue with the human residue. For the Human Engineered™ light chain sequence in Figures 20A-B, human consensus kappa 3 (based on Kabat) was used as the template, and for each position where the murine and human amino acid residues differed at low or moderate risk positions, an amino acid modification was introduced that replaced the murine residue with the human residue. A total of 19 low and moderate risk amino acid modifications were made to the light chain and 12 low and moderate modifications were made to the heavy chain.

An "alternative low risk" light chain sequence was also prepared as shown in Figures 21A-B, in which the modification at position 54 was reversed back to murine. An "alternative low+moderate risk" light chain sequence was also prepared as shown in Figures 21A-B, in which the modifications at positions 54-56 were reversed back to murine.

Finally, a Human Engineered™ "low+moderate risk" light chain V region sequence also was produced using human germline VK6 subgroup 2-1-(1) A14 as the template, as shown in Figures 22A-B.

Also contemplated by the present invention is retaining amino acids 41-43 (NGS) of Figure 4A which represent the glycosylation site. Alternatively, only one or two of amino acids 41-43 (e.g., NG) may be retained.

Preparation of Expression Vectors for Permanent Cell Line Development

DNA fragments encoding each of the above-described heavy and light chain V region sequences along with antibody-derived signal sequences were constructed using synthetic nucleotide synthesis. DNA encoding each of the light chain V region amino acid sequences described above were inserted into vector pMXP10 containing the human Kappa light chain constant region. DNA encoding each of the heavy chain V region amino acid sequences described above were inserted into vector pMXP6 containing the human Gamma-2 heavy chain constant region. Additional vectors were constructed containing the the heavy chain V region amino acid sequences fused to the human Gamma-1 (cDNA)and Gamma-4 (genomic and cDNA) constant regions having sequences displayed in figures 29A, 29b, and 30. All of these vectors contain a hCMV promoter and a mouse kappa light chain 3' untranslated region as well as selectable marker genes such as *neo* or or *his* for selection of G418 – or histidinol – resistant transfectants, respectively. The light and heavy chain vectors are described in Tables 2 and 3, respectively.

Table 2. Single gene permanent Kappa light chain vectors.

Plasmid	V Region	Selective Marker
pMXC5	Low + Mod Risk (Kabat)	*neo*
pMXC6	Low Risk (Kabat)	*neo*
pMXC13	Low Risk (Kabat) – R54 to S	*neo*
pMXC14	Low+Mod Risk (Kabat)–RAT54,55,56 to SIS	*neo*
pMXC22	Low + Mod Risk (Germline)	*neo*

Table 3. Single gene permanent heavy chain vectors.

			Selective

Plasmid	V Region	C Region	Marker
pMXC7	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC8	Low Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC40	Low Risk (Kabat)	Gamma 1	*neo*
pMXC41	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 1	*neo*
pMXC45	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 4 (genomic)	*neo*
pMXC46	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 4 (cDNA)	*neo*

Vectors comprising the desired Human Engineered™ light plus heavy chain genes (Gamma-1, Gamma-2 and Gamma-4) were then constructed. These "2-Gene" vectors contain genes encoding each antibody chain, heavy and light, under control of the hCMV promoter, CMV splice donor, SV40 16S splice acceptor and the mouse kappa light chain 3' untranslated DNA including the polyA site. They also contain a selectable marker gene such as *neo* or *his* and the ampicillin resistance gene. Vectors containing both heavy and light chain genes are described in Table 4. Vectors comprising two copies of each light and heavy chain genes (four gene vectors) also can be constructed.

Table 4. Two-gene permanent expression vectors

		Heavy Chain		
Plasmid	Kappa Light Chain	V region	C region	Selective Marker
pMXC12	Low Risk (Kabat)	Low Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC37	Low Risk (Kabat)	Low Risk (Kabat)	Gamma 2	*his*
pMXC9	Low + Mod Risk (Kabat)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC16	Low Risk (Kabat)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC17	Low + Mod Risk (Kabat)	Low Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC18	Low Risk (Kabat) R54 to S	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC19	Low+Mod Risk (Kabat)– RAT54,55,56 to SIS	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC20	Low Risk (Kabat) – R54 to S	Low Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC21	Low+Mod Risk (Kabat)– RAT54,55,56 to SIS	Low Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC25	Low + Mod Risk (Germline)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*
pMXC47	Low + Mod Risk (Germline)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2	*his*
pMXC26	Low + Mod Risk (Germline)	Low Risk (Kabat)	Gamma 2	*neo*

pMXC42	Low + Mod Risk (Germline)	Low Risk (Kabat)	Gamma 1	*neo*
pMXC43	Low + Mod Risk (Germline)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 1	*neo*
pMXC50	Low + Mod Risk (Germline)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 1	*his*
pMXC48	Low + Mod Risk (Germline)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 4 (cDNA)	*Neo*
pMXC49	Low + Mod Risk (Germline)	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 4 (genomic)	*neo*

Preparation of Expression Vectors for Transient Expression

Vectors containing either the light or heavy chain genes described above also were constructed for transient transfection. These vectors are similar to those described above for permanent transfections except that instead of the *neo* or *his* genes, they contain the Epstein-Barr virus *ori*P for replication in HEK293 cells that express the Epstein-Barr virus nuclear antigen. The vectors for transient transfection are described in Tables 5 and 6.

Table 5. Transient Kappa light chain vectors.

Plasmid	V Region
pMXC1	Low + Mod Risk (Kabat)
pMXC2	Low Risk (Kabat)
pMXC10	Low+Mod Risk (Kabat)–RAT54,55,56 to SIS
pMXC11	Low Risk (Kabat) – R54 to S
pMXC15	Low + Mod Risk (Germline)

Table 6. Transient heavy chain vectors.

Plasmid	V Region	C Region
pMXC3	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 2
pMXC4	Low Risk (Kabat)	Gamma 2
pMXC29	Low Risk (Kabat)	Gamma 1
pMXC38	Low Risk (Kabat)	Gamma 4 (genomic)
pMXC39	Low + Mod Risk (Kabat)	Gamma 1

Transient Expression of Human-Engineered RX1 in HEK293E Cells

Separate vectors each containing *oriP* from the Epstein-Barr Virus and the light chain or heavy chain genes described above were transfected transiently into HEK293E cells. Transiently transfected cells were allowed to incubate for up to 10 days after which the supernatant was recovered and antibody purified using Protein A chromatography. The proteins produced by transient transfection of 293E cells are described in Table 7 below.

Table 7. Human-engineered RX1 antibodies prepared.

	Light Chain		Heavy Chain	
Antibody	**Plasmid**	**Protein**	**Plasmid**	**Protein**
heRX1-1.G2	pMXC2	Low Risk (Kabat)	pMXC4	Low Risk (Kabat)
heRX1-2.G2	pMXC2	Low Risk (Kabat)	pMXC3	Low + Mod Risk (Kabat)
heRX1-3.G2	pMXC1	Low + Mod Risk (Kabat)	pMXC4	Low Risk (Kabat)
heRX1-4.G2	pMXC1	Low + Mod Risk (Kabat)	pMXC3	Low + Mod Risk (Kabat)
heRX1-5.G2	pMXC11	Low Risk (Kabat) – R54 to S	pMXC4	Low Risk (Kabat)
heRX1-6.G2	pMXC11	Low Risk (Kabat) – R54 to S	pMXC4	Low Risk (Kabat)
heRX1-7.G2	pMXC10	Low+Mod Risk (Kabat)– RAT54,55,56 to SIS	pMXC4	Low Risk (Kabat)
heRX1-8.G2	pMXC10	Low+Mod Risk (Kabat)– RAT 54,55,56 to SIS	pMXC3	Low + Mod Risk (Kabat)
heRX1-9.G2	pMXC15	Low + Mod Risk (Germline)	pMXC4	Low Risk (Kabat)
heRX1-10.G2	pMXC15	Low + Mod Risk (Germline)	pMXC3	Low + Mod Risk (Kabat)
heRX1-1.G1	pMXC2	Low Risk (Germline)	pMXC29	Low Risk (Kabat)
heRX1-10.G1	pMXC15	Low + Mod Risk (Germline)	pMXC39	Low + Mod Risk (Kabat)
heRX1-9.G4	pMXC15	Low + Mod Risk (Germline)	pMXC38	Low Risk (Kabat)

Development of Permanently Transfected CHO-K1 Cells

The vectors described above (Table 4) containing one copy each of the light and heavy genes together are transfected into Ex-Cell 302-adapted CHO-K1 cells. CHO-K1 cells

adapted to suspension growth in Ex-Cell 302 medium are typically electroporated with 40 ug of linearized vector. Alternatively, linearized DNA can be complexed with linear polyethyleneimine (PEI) and used for transfection. The cells are plated in 96 well plates containing Ex-Cell 302 medium supplemented with 1% FBS and G418. Clones are screened in 96 well plates and the top ~10% of clones from each transfection are transferred to 24 well plates containing Ex-Cell 302 medium.

A productivity test is performed in 24 well plates in Ex-Cell 302 medium for cultures grown for 7 and 14 days at which time culture supernatants are tested for levels of secreted antibody by an immunoglobulin ELISA assay for IgG.

The top clones are transferred to shake flasks containing Ex-Cell 302 medium. As soon as the cells are adapted to suspension growth, a shake flask test is performed with these clones in Ex-Cell 302 medium. The cells are grown for up to 10 days in 125 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml media. The flasks are opened at least every other day of the incubation period to allow for gas exchange and the levels of immunoglobulin polypeptide in the culture medium are determined by IgG ELISA at the end of the incubation period. Multiple sequential transfections of the same cell line with two or three multi-unit transcription vectors results in clones and cell lines that exhibit further increases in levels of immunoglobulin production, preferably to 300 μg/ml or more.

Purification

A process for the purification of immunoglobulin polypeptides from vectors and all lines according to the invention may be designed. According to methods well known in the art, cells are removed by filtration after termination. The filtrate is loaded onto a Protein A column (in multiple passes, if needed). The column is washed and then the expressed and secreted immunoglobulin polypeptides are eluted from the column. For preparation of antibody product, the Protein A pool is held at a low pH (pH 3 for a minimum of 30 minutes and a maximum of one hour) as a viral inactivation step. An adsorptive cation exchange step is next used to further purify the product. The eluate from the adsorptive separation column is passed through a virus retaining filter to provide further clearance of potential viral particles. The filtrate is further purified by passing through an anion exchange column in which the product does not bind. Finally, the purification process is concluded by transferring the product into the formulation buffer through diafiltration. The retentate is adjusted to a protein concentration of at least 1 mg/mL and a stabilizer is added.

60

Binding activity

The MCSF binding activity of the recombinant Human Engineered™ antibodies is evaluated. Protein is purified from shake flask culture supernatants by passage over a protein A column followed by concentration determination by A_{280}. Binding assays are performed as described in Example 1 above or 12 below. Immulon II plates are precoated with the sM-CSF antigen pre-diluted in a PBS coating solution to immobilize it to the microplate. Various test concentrations of M-CSF ranging from 0.25 to 20 ug/ml are added at 50 ul/well and incubated at 4°C overnight. The plates are then washed 3 times with PBS-0.05% Tween. Blocking is performed by adding in PBS-0.05% Tween 1% BSA followed by a 30 minute incubation at 37°C. Dilutions of immunoglobulin polypeptides are prepared in PBS-0.05% Tween 1% BSA solution. 2- or 3-fold serial dilutions are prepared and added (100 ul/well) in duplicate or triplicate. After a 90 minute incubation at 37°C, the microplate is washed 3 times with PBS-0.05% Tween. For signal development, goat anti-human IgG (gamma- or Fc-specific) secondary antibody conjugated to peroxidase is added to each well and incubated for 60 minutes at 37°C followed by addition of OPD at 0.4 mg/ml in citrate buffer plus 0.012% H_2O_2. After 5 – 10 minutes at room temperature the assay is stopped by the addition of 100 ul 1M H_2SO_4 and the plates are read at 490nm. Both goat anti-human IgG (gamma-specific) and goat anti-human IgG (Fc-specific) antibodies have been employed.

EXAMPLE 5

The following example sets out a procedure for the treatment of humans using M-CSF-specific antibody, such as an RX1-derived or RX1-competing antibody, including an RX1 Human Engineered™ antibody with a modified or unmodified IgG1 or IgG4 constant region. The procedure can also be followed for an MC1- or MC3-derived or MC1- or MC3-competing antibody. The expected efficacious dosing range is 2 ug/kg to 10 mg/kg. This estimation is based on following rationale substantiated by experimental data:

The measured M-CSF level in human plasma (both healthy and breast cancer patients) is about 1 ng/ml. M-CSF neutralizing antibody RX1 has a measured EC_{50} of 2 ng/ml against 1 ng/ml human M-CSF. Accordingly, the effective antibody concentration in human plasma is expected to be 10 to 50,000 fold over its EC_{50}, i.e. 20 ng/ml to 100 ug/ml antibody in human plasma. Based on PK studies, in order to effectuate this concentration in human patients, a dosing of 2 μg/kg to 10 mg/kg is required to reach 20 ng/ml to 100 ug/ml

antibody concentration in plasma.

EXAMPLE 6

This example sets out a procedure for the evaluation of the anti-cancer activity of anti-M-CSF monoclonal antibody in a subcutaneous model. Example 2 above showed that anti-M-CSF monoclonal antibody treatment significantly inhibited the tumor growth in bone marrow. The purpose of this study is to evaluate whether the antibody can also inhibit the tumor growth in soft tissue.

Female nu/nu mice at the age of 10 weeks old, average weight ~20g will be used for this study. Mice will undergo an acclimation period of at least 7 days prior to study start. On day 0, the right flank of nude mice will be injected with SW620 human colon cancer cells subcutaneously at $5x10^6$ cells per mouse per 100µl. When tumor volume reaches 100-200 mm^3 (usually 1 week after tumor inoculation), mice will be randomized into 5 groups at 10 mice per group as follows:

1) PBS
2) RX1
3) 5A1
4) mIgG1+rIgG1 isotype Ab control
5) 5A1+RX1

Mice will be treated intraperitoneally with the designated antibodies at 10mpk once a week for 4 weeks. When tumor volume reaches 2000 mm^3, the study will be terminated. Alternatively, animals will also be euthanized when any of the following situations are met: tumor surface ulceration is bigger than 30% of total tumor surface area, significant body weight loss (>20%), dehydration, and moribund. Whole blood will be collected from all of the mice and monocyte population will be analyzed as a potential surrogate marker. Tumor growth/size will be measured by 2-D analysis. Measurements of tumor width and length will be used to calculate tumor volume. It is expected that tumor growth in soft tissue will be inhibted as a result of the foregoing experiment.

EXAMPLE 7

The following example sets out a procedure for the evaluation of combination therapy for the treatment and prevention of severe osteolytic disease associated with cancer

metastasis.

Experimental Design. The study described in Example 5 above is repeated essentially as described with the following exceptions. In addition to the antibody or antibody combination set out in the treatment groups below, the animals will receive one of the following additional treatments:

1. Bisphosphonate (e.g., Aredia; Zometa; Clodronate).
2. Surgery
3. Radiation
4. Chemotherapy
5. Hormone therapy (e.g., Tamoxifen; anti-Androgen therapy)
6. Antibody therapy (e.g., RANKL/RANK neutralizing antibodies; PTHrP neutralizing antibody)
7. Therapeutic protein therapy (e.g., soluble RANKL receptor; OPG, and PDGF and MMP inhibitors)
8. Small molecule drug therapy (e.g., Src-kinase inhibitor)
9. Oligonucleotides therapy (e.g., RANKL or RANK or PTHrP Anti-sense)
10. Gene therapy (e.g., RANKL or RANK inhibitors)
11. Peptide therapy (e.g. mutcins of RANKL)

The treatment groups are as follows. The above additional treatments are indicated below as "plus therapy X":

1. PBS only
2. treatment with therapy X only
3. rat IgG1 isotype control
4. murine IG1 isotype control
5. RX1 anti-human MCSF only
6. 5A1 rat IgG1 anti-mouse MCSF only
7. rat IgG1 and murine IgG1 isotype control combination
8. RX1 an 5A1 combination
9. rat IgG1 isotype control plus therapy X
10. murine IG1 isotype control plus therapy X
11. RX1 anti-human MCSF plus therapy X
12. 5A1 rat IgG1 anti-mouse MCSF plus therapy X
13. rat IgG1 and murine IgG1 isotype control combination plus therapy X
14. RX1 and 5A1 combination plus therapy X

Dosing: 0.1-30 mg/kg each antibody is used for administration to each animal. Preferred dosing is 10 mg/kg. The administration route can be IV, IP, SC. The preferred route is IP. Treatment will begin the day following injection of tumor cells, as described in Example 5, above.

Measurements. To assess the severity of osteolysis among the various

treatment groups, each mouse receives a baseline Faxitron image taken the day following injection of tumor cells. A Faxitron image is also taken at the end of the study (8 weeks). Tumor growth is simultaneously measured using the Xenogen system since the tumor cells stably express luciferase. It is expected that combination therapy for the treatment and prevention severe osteolytic disease associated with cancer metastasis will be improved with relative to antibody therapy alone.

EXAMPLE 8

The following example provides a protocol for evaluating the ability of M-CSF-specific antibody to bind to, for example, breast cancer cells (cell line MDA231) or multiple myeloma cancer cells (cell line ARH77) using a fluorescence-activated cell sorter.

The cells were first washed twice with PBS (no Ca^{2+}, Mg^{2+}). For each 10-cm plate, 2ml of 3 mM EDTA was added, and the paltes were incubated at 37 °C for 2-3 minutes, until the cells were rounded and began to detach from the dish. Next, 10 ml of buffer A (PBS + 5% FBS) was added and mixed. At that time, the cells were pelleted and resuspended at about $5x10^6$ cells/ml in PBS+5% FBS, and the cells were placed into tubules at 100 µl/sample.

At this point, 0.1-10 ug/ml of the primary antibody (used at indicated concentration of M-CSF antibody or control antibody) was added. Dilution, if necessary, was made in 5% FBS/PBS. The mixture was then incubated for 30 min at 4 °C. Following the incubation period, the cells were washed 3 times by centrifugation at 400 g for 5 min., and the cells were resuspended in PBS.

The FITC or PE-labeld anti-IgG antibody (0.25 ug/sample) was diluted in 1% BSA/PBS at the optimal dilution, and the cells were resuspended in this solution and incubated for 30 min at 4 °C. Next, the cells were washed 3 times as described above. Following th cell washes, the cells were resuspended with 0.5 ml/sample PI-PBS (if necessary to distinguish dead cells from live ones). The cells can also be fixed for later analysis (the cells can last about 3 days if they are fixed with 0.1% formaldehyde). The cells were next analyzed in a fluorescence-active FACS using standard procedures.

As shown in Figure 8A and 8B, an MCSF-specific antibody RX1 bound to breast cancer cell line MDA231 or to multiple myeloma cancer cell line ARH77 at a variety of antibody concentrations as indicated.

EXAMPLE 9

The following example shows M-CSF is prevalent on a number of cancer cell surfaces. Immunohistochemical staining of M-CSF was carried using a M-CSF-specific antibody RX1 was carried out as follows.

At the outset, slides were heated in anoven at 55 – 60°C for 1 hour and allowed to cool for 2-3 minutes. The following de-waxing and re-hydration parameters were used:

a. Xylene	3 x 5 minutes
b. 100% Reagent Alcohol	2 x 5 minutes
c. 95% Reagent Alcohol	2 x 4 minutes
d. 75% Reagent Alcohol	2 x 3 minutes
e. 50% Reagent Alcohol	1 x 3minutes
g. dI H2O	2 – 3 quick rinses

Prior to the peroxide blocking step, antigen retrieval was prepared using 1 x Biogenex Citra Plus. The solution was initially microwaved at full power to boil. Once the solution boiled, the microwave was quickly set for another 13 min at power-level 2, and allowed to cool before proceeding. The peroxide blocking step was performed as follows. The slides were immersed slides in 3% H_2O_2 (25ml 30% to 250ml dI H_2O) and placed at room temperature for 10 minutes. The slides were next rinsed 2x with dI H_2O, and washed with 1 X PBS 2 x 2 minutes.

The avidin/biotin blocking procedure was performed as follows. Slides were palced flat on a metal rack. A Blue PAP pen was used (hydrophobic slide marker) around tissue. Next, 2 drops Zymed Avidin (Reagent A)—enough to cover tissue--was added and the slides were incuabated at room temperature for 10 min. Following the incubation, , the slides were washed as follows:

2 x 3 minute washes in 1 X PBS.

2 drops Zymed Biotin (Reagent B), room temperature for 10 min.

2 x 3 minute washes in 1 X PBS.

The protein block ing procedure was performed as follows. First, 10% serum [to 2% final concentration] of secondary antibody species was added. The BioGenex Power Block was next diluted to 1 X with dI H_2O. The rack of slides was immersed in Power Block for 8 min at room temperature, and the slides were rinsed 2x in 1X PBS.

For the addition of the primary antibody (RX1), the slides were placed flat on a metal rack. Antibody was added to cover each section (~350µl), and the antibody was spread with pipet tip (if necessary) without scraping tissue. The slides were then incubated for 1 hour at room temperature. Following the incubation, the slides were washed 3 x with 1 x PBS 3-5 minutes each time. At this point, BioGenex Multi-Link was applied to sections & incubated for 10-11 minutes at room temperature. The sections were then washed 3 minutes each time.

Labelling was performed by applying BioGenex HRP Label to sections, which were then incubated at room temperature for 10-11 min and washed with 1 x PBS 3 x 3 minutes. Next, BioGenex H_2O_2 substrate was added (1 drop AEC for every 2.5 ml H2O2) to the sections and incubated at room temperature for 10 min. The sections were then rinsed several times with dI H_2O. The counterstaining step was performed as follows. The sections were staine with hematoxylin for 1 minute at room temperature. Next, the sections were rinse with H_2O twice, and then incubated in 1 X PBS for 1 minute. Sections were then rinsed well with H_2O to remove PBS. Sections were mounted by applying a drop of BioGenex Super Mount to the section section and then air drying over night at room temperature.

As shown in Figure 9, M-CSF is prevalent on a number of cancer cell surfaces. Sections for the indicated cancer cell types were scored as follows:

0 No staining

1 Staining was similar to background

2 Positive, but weak staining

3 Positive and significant staining

4 Positive and strong staining

EXAMPLE 10

The following example shows the procedure for producing antibodies MC1 and MC3. MC1 and MC3 are two monoclonal murine antibodies that neutralize human M-CSF antibody

and bind to human M-CSF. The amino acid sequences of these antibodies are shown in Figures 14 and 15, respectively. They were identified by a series of steps including a) immunization of Balb C mice with recombinant human M-CSF; b) screening for positive clones that produce antibodies which bind to human M-CSF in an ELISA format; c) subcloning of positive clones to generate stable hybridoma clones; d) scale-up of cell culture to produce large quantity of antibodies; e) purification and characterization of antibodies in affinity analysis, cell binding, and neutralizing activity assay as described in previous examples.

Figures 16A and 16B show the alignment of the CDRs of the heavy and light chains, respectively, of antibodies RX1, 5H4, MC1 and MC3.

Humanized and Human Engineered™ versions are generated as described in the examples above.

EXAMPLE 11

This example shows that M-CSF antibodies RX1 and 5H4, as well as Fab fragments thereof, have different neutralizing activities. The following example also shows that antibodies RX1, 5H4, and MC3 have varying affinities for M-CSF. This example further demonstrates that the affinities of the aforementioned intact antibodies are higher relative to Fab fragments of the aforementioned antibodies.

Neutralization activities of intact RX1 and 5H4 versus Fab fragments of RX1 and 5H4 were determined by measuring M-CSF-dependent cell proliferation in the presence of various concentrations of antibody. The cell proliferation was determined by chemiluminescent dye. As shown in Figure 17, intact RX1 has the highest potency, while the Fab fragment of RX1 loses its potency and behaves like 5H4 and the 5H4 Fab fragment.

Binding properties of the aforementioned antibodies were analyzed using Biacore analyses. In order to determine the relative affinities of RX1, 5H4, and MC3 to M-CSF, rabbit anti-mouse Fc was immobilized onto a CM5 biosensor chip via amine coupling. The aforementioned antibodies were then captured on the anti-mouse Fc/CM5 biosensor chip at 1.5μg/ml for 3 min at 2μl/min. MCSF was flowed over the modified biosensor surface at varying concentrations (Rmax ~15). Test antibodies and antigen were diluted in 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCL, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP). All experiments were performed at 25°C. Kinetic and affinity constants were determined using

Biaevaluation software (Biacore) with a 1:1 interaction model/global fit. As shown below in Table 8, RX1 binds to M-CSF with the highest affinity relative to 5H4 and MC3.

Table 8

	Ka (M-1 Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
RX1	1.64e6	2.7e-4	0.16
5H4	5.94e5	1.77e-3	3.0
MC3	7.04e5	1.93e-4	0.27

To determine the relative differences in the binding affinity of intact Mab and Fab fragments of RX1, 5H4, and MC3, an alternate configuration was used in the Biacore analysis. Specifically, M-CSF was immobilized onto CM5 biosensor chip via amine coupling. 0.05µg/ml M-CSF in 10mM Na Acetate pH 4.0 was injected at 1 µl/min for 5 minutes to achieve RL=6-12 RU. Test antibody (or Fab fragment) were flowed over the modified biosensor surface at varying concentrations. Test antibodies were diluted in 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCL, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP) and all experiments were done at 25°C. Kinetic and affinity constants were determined using Biaevaluation software (Biacore) with a 1:1 interaction model/global fit. As shown below in Table 9, RX1 binds M-CSF with the highest affinity relative to the other antibodies tested. The Fab fragment of RX1 binds M-SCF with a significantly lower affinity relative to the RX1 holoprotein.

Table 9

	Ka (M-1 Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
rRX1(mouse)	2.34e5	2.35e-4	1.0
rRX1 Fab (mouse)	2.81e5	3.03e-3	10.8
5H4	1.27e5	1.26e-3	9.9
5H4 Fab	2.04e5	2.85e-3	14.0

The binding affinity and neutralization data indicate that the neutralization activity of RX1 is due primarily to its remarkably high affinity for M-CSF, and that this high affinity may be due at least in part to the ability of both arms of the antibody to bind the M-CSF dimer simultaneously.

EXAMPLE 12

The following example reveals the linear epitope (i.e., amino acid sequence) on M-CSF recognized by antibodies RX1, 5H4, and MC3.

Initially, the epitope mapping strategy was designed to determine whether antibodies RX1, 5H4, and MC3 recognized linear epitopes or conformational epitopes within M-CSF. Accordingly, the anti-M-CSF antibodies were tested against 0.1μg M-CSF under reducing as well as non-reducing conditions. Only the the non-reduced form of M-CSF was recognized by each of the antibodies, suggesting the epitopes recognized are discontinuous in nature.

Next, the linear epitope of M-CSF was determined for each antibody. Specifically, SPOTs membranes (Sigma Genosys) were prepared where the M-CSF fragment sequence of interest, overlapping 10mer peptides synthesized with one amino acid offset, were loaded onto the cellulose membrane support. These membranes were then probed with the aforementioned antibodies and reactive SPOTs were identified. The peptide sequence was then identified by its corresponding location on the membrane, and overlapping amino acids within the positive reacting peptides were identified as the epitope. As shown in Figure 18, RX1 binds to a different linear epitope than 5H4 and MC3, which map to a different location on M-CSF. RX1 binds to a linear epitope represented by RFRDNTPN (SEQ ID NO: 120) or RFRDNTAN (SEQ ID NO: 121), amino acids 98-105 of M-CSF of Figure 12. 5H4 binds to a linear epitope represented by ITFEFVDQE (SEQ ID NO: 122), amino acids 65-73 of M-CSF of Figure 12. MC3 binds to two linear epitopes represented by (1) ITFEFVDQE (SEQ ID NO: 122), amino acids 65-73 of M-CSF of Figure 12 and (2) FYETPLQ (SEQ ID NO: 123), amino acids 138-144 of M-CSF of Figure 12.

EXAMPLE 13

The binding affinity of the Human Engineered™ versions of RX1 antibodies prepared as described above in Example 4A was determined. This example shows that Human Engineered™ RX1 antibodies with different IgG subclass constant regions bind M-CSF with different affinities *in vitro*. To determine the relative differences in the binding affinity of intact antibodies by Biacore analysis, M-CSF was immobilized onto CM5 biosensor chip via amine coupling. 0.05μg/ml M-CSF in 10mM Na-Acetate pH 4.0 was

injected at 1 µl/min for 5 minutes to achieve RL=6-12 RU. Test antibody or Fab fragments were flowed over the modified biosensor surface at varying concentrations ranging from 100nM to 1.5 nM in 2-fold dilutions. Test antibodies were diluted in 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCL, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP) and all experiments were done at 25°C. Each concentration point and buffer blanks were run in triplicate, and data was collected over 3 minutes of association and 8 minutes of dissociation. Kinetic and affinity constants were determined using Biaevaluation software with a 1:1 interaction model/global fit. As shown in Table 10 below, heRX1-1.G1 and heRX1-1.G4 binds M-CSF with affinities that most closely resemble the murine RX1–M-CSF binding affinity.

Table 10.

Antibody	*ka (M-1 sec-1)*	*kd (sec-1)*	*KD (nM)*
Murine RX1 n=21	$(2.23 \pm 0.35) \times 10^5$	$(1.56 \pm 0.67) \times 10^{-4}$	0.7 ± 0.27
heRX1-1.G2 n=5	$(2.36 \pm 0.18) \times 10^5$	$(1.37 \pm 0.24) \times 10^{-3}$	5.9 ± 1.4
heRX1-10.G2 n=2	$(1.73 \pm 0.29) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	6.3 ± 1.7
heRX1-1.G1	2.50×10^5	2.38×10^{-4}	0.95
heRX1-1.G4	2.07×10^5	2.93×10^{-4}	1.42

In contrast, as shown in Table 11 below, although there was some variation in binding affinity, all of the Gamma-2 constructs displayed at least a 7-fold decrease in binding affinity compared to the parent murine antibody.

Table 11.

Antibody	*ka (M-1 sec-1)*	*kd (sec-1)*	*KD (nM)*
Murine RX1 n=21	$(2.23 \pm 0.35) \times 10^5$	$(1.56 \pm 0.67) \times 10^{-4}$	0.7 ± 0.27
heRX1-1.G2 n=5	$(2.36 \pm 0.18) \times 10^5$	$(1.37 \pm 0.24) \times 10^{-3}$	5.9 ± 1.4
heRX1-2.G2	2.18×10^5	1.65×10^{-3}	7.6
heRX1-3.G2	2.01×10^5	1.18×10^{-3}	5.9
heRX1-4.G2	2.38×10^5	1.08×10^{-3}	4.6

65

heRX1-5.G2	1.75×10^5	1.29×10^{-3}	7.4
heRX1-6.G2	1.88×10^5	1.49×10^{-3}	7.9
heRX1-7.G2	1.57×10^5	1.49×10^{-3}	9.5
heRX1-8.G2	1.52×10^5	1.48×10^{-3}	9.8
he RX1-9.G2	2×10^5	1.44×10^{-3}	7.2
heRX1-10.G2 n=2	$(1.73 \pm 0.29) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	6.3 ± 1.7

EXAMPLE 14

This example shows that Human Engineered™ RX1 antibodies with different IgG subclass constant regions possess different neutralization activities *in vitro*. To test the neutralizing activity of M-CSF antibodies, a proliferation assay of M-NFS-60 cell line was used (American Type Culture Collection, Accession No. CRL-1838, available from ATCC in Rockville, MD, USA, derived from a myologenous leukemia induced with the Cas-Br.MuLV wild mouse ecotropic retrovirus. The cell line responds to both interleukin 3 and M-CSF and contains a truncated c-myb proto-oncogene caused by the integration of a retrovirus). Proliferation of M-NFS-60 requires active M-CSF in a dose-dependent fashion. In the assay, M-NFS-60 cells were washed and plated in RPIM1640 medium with 10% FBS and 1% Pen/Strep. Recombinant human M-CSF (at 10 ng/ml final concentration, which is equivalent to 3000 U/ml of M-CSF activity), was incubated with various concentrations of antibodies ranging from 1 ug/ml to 0.5 ng/ml (in serial 2-fold dilution) for 1 hour at 37°C in 5% CO_2 in an incubator. Following the incubation, the mixture was added to the M-NFS-60 culture in 96 well microtiter plates. The total assay volume per well was 100 ul, with 10 ng/ml M-CSF, and the antibody concentration indicated. Cells were incubated at 37°C under 5% CO_2 for 72 hours before cell numbers were quantified by CellTiter Glo assay (Promega). Each antibody was tested in triplicate, with a repeat on the following day (for a total of six assays per antibody). The IC50 of each antibody was analyzed by curve fit.

The assay was repeated using human MCSF in serum, MDA231 conditioned medium (which contains M-CSF), cynomologous monkey MCSF in serum, and cynomologous monkey recombinant MCSF. The results are presented in Figures 25 (recombinant MCSF), 26 (human MCSF in serum) and 27 (MDA231 conditioned medium) as the fluorescent reading from CellTiter Glo assay, which is linear with cell number. Neutralizing activity of the antibodies is shown as an inhibition of the proliferation of M-

NFS-60 cells.

The results show that the IC50 of heRX1-1-IgG1 and heRX1-1-IgG4 were about the same as the recombinant murine parent RX1 antibody, while the IC50 of heRX1-1-IgG2 was about 2-fold to 4-fold higher.

Table 12 below shows the relative IC50 (in terms of IC50 fold loss) of the various IgG2 constructs prepared as described above in Example 4A. Of these constructs, heRX1-1.G2 and heRX1-10.G2 showed the least reduction in IC50.

Table 12.

Antibody	IC50 Fold Loss
heRX1-1.G2	2.8x
heRX1-2.G2	3.1x
heRX1-3.G2	5.3x
heRX1-4.G2	4.6x
heRX1-5.G2	6.5x
heRX1-6.G2	5.9x
heRX1-7.G2	6.1x
heRX1-8.G2	5.9x
heRX1-9.G2	3.6x
heRX1-10.G2	2.2x
heRX1-1.G1	No loss
heRX1-1.G4	No loss
heRX1-10.G1	No loss
heRX1-10.G4	No loss

EXAMPLE 15

This example shows that Human Engineered™ RX1 antibodies with different IgG subclass constant regions possess different TRAP activities in an *in vitro* osteoclastogenesis assay.

The human bone marrow CD34+ cells (Biowhittaker catalog number 2M-101A, 3x 10^5 cells / vial) were induced to differentiate into osteoclasts under the experimental conditions described herein. On Day 1, CD34+ cells were thawed from one frozen vial into 10 ml of media (Alpha MEM with 10% FCS, 1 x Pen Strep and 1x

fungizone). The cells were washed once and re-suspended in 2 ml of media and placed into a 96 well plate at 100 ul per well. On Day 2, without removing the original media, 50 ul of 4x CSF-1 to 30 ng/ml final concentration and 50 ul of 4x RANKL (sRANKL, Chemicon catalog # GF091, 10 ug/package) to final concentration of 100 ng/ml was added to each well. On Day 7, 50 ul of 5x RANKL to final concentration of 100 ng/ml was added to each well. On Day 17, the cells were stained for TRAP activity (Leukocyte Acid Phosphatase kit for TRAP staining, Sigma catalog# 387-A) and examined under the microscope.

M-CSF-neutralizing antibodies are added on Day 2 of the assay. The antibodies inhibit osteoclast differentiation in a dose-dependent manner as shown in Figure 28. The inhibitory activity of the antibodies in the osteoclast differentiation assay is shown as lack of visible osteoclasts on Day 17 of the assay.

EXAMPLE 16

The Human Engineered™ RX1 antibodies with different IgG subclass constant regions were further characterized.

The antigen-antibody complexes that the various Human Engineered™ RX1 antibodies formed with MCSF were studied by combining M-CSF and antibody in buffer at equal molar ratios, followed by analysis of the size of the antigen-antibody complex using size exclusion chromatography or light scattering. The results showed that the murine parent RX1 appeared to form 1:1 complexes with MCSF of about 200 kDa. The heRX1-9.G2 or 1-10.G2 antibodies appeared to form 2:1 or 2:2 complexes with MCSF of about 400 kDa. The heRX1-1.G2 appeared to form large lattice aggregates with MCSF of greater than 2×10^6 Da. The IgG1 and IgG4 constructs formed small complexes similar to that of murine parent RX1.

Denaturing reducing and non-reducing SDS-PAGE of heRX1-1.G4 showed that the IgG4 version appeared to form half-antibodies, as expected.

All of the above U.S. patents, U.S. patent application publications, U.S. patent applications, foreign patents, foreign patent applications and non patent publications referred to in this specification and/or listed in the Application Data Sheet, are incorporated herein by reference, in their entirety.

From the foregoing it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention.

What is claimed:

1. A non-murine antibody that competes with monoclonal antibody RX1 for binding to M-CSF by more than 75%, wherein said monoclonal antibody RX1 comprising the heavy chain and light chain amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs: 2 and 4, respectively.

2. The antibody of claim 1 that specifically binds to the same epitope of M-CSF as monoclonal antibody RX1, wherein said monoclonal antibody RX1 comprises the heavy chain and light chain amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs: 2 and 4, respectively.

3. The antibody of claim 2 that binds an epitope of M-CSF that comprises at least 4 contiguous residues of SEQ ID NO: 120 or 121.

4. The antibody of claim 2 that binds an epitope of M-CSF that comprises SEQ ID NO: 120 or 121.

5. The antibody of any of claims 1-4 that is a monoclonal antibody.

6. The antibody of any of claims 1-4 that is a chimeric antibody, a humanized antibody, a human engineered antibody, a human antibody, or a single chain antibody.

7. The antibody of any of claims 1-6 that is an IgG antibody.

8. The antibody of any of claims 1-4 that is an Fab fragment, an F(ab')2 fragment, an Fv fragment, or a single chain Fv fragment.

9. The antibody of any of claims 1-8 that retains an affinity K_d (dissociation equilibrium constant) with respect to M-CSF of SEQ ID NO: 9 of at least 10^{-7} M or higher.

10. The antibody of claim 9 that retains an affinity Kd with respect to M-CSF of SEQ ID NO: 9 of at least 10^{-8} M or higher.

11. The antibody of claim 10 that retains an affinity Kd with respect to M-CSF of SEQ ID NO: 9 of at least 10^{-9} M or higher.

12. The antibody of any of claims 1-11 that comprises an amino acid sequence 90% identical to SEQ ID NO: 24.

13. The antibody of claim 11 that comprises SEQ ID NO: 24.

14. The antibody of any of claims 1-13 that comprises at least 1 of SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 29, 32, and 36.

15. The antibody of any of claims 1-13 that comprises at least 2 of SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 29, 32, and 36.

16. The antibody of any of claims 1-13 that comprises at least 3 of SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 29, 32, and 36.

17. The antibody of any of claims 1-13 that comprises at least 4 of SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 29, 32, and 36.

18. The antibody of any of claims 1-13 that comprises at least 5 of SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 29, 32, and 36.

19. The antibody of any of claims 1-13 that comprises all of SEQ ID NOs: 18, 21, 24, 29, 32, and 36.

20. The antibody of any of claims 11-18 that further comprises one or more of SEQ ID NOs: 16, 19, 22, 27, 30, and 34.

21. The antibody of any of claims 11-18 that further comprises one or more of SEQ ID NOs: 17, 20, 23, 28, 31, and 35.

22. The antibody of any of claims 11-18 that further comprises one or more of SEQ ID NOs: 18, 21, 25, 29, 32, and 37.

23. The antibody of any of claims 11-18 that further comprises one or more consensus CDRs set forth in SEQ ID NOs: 18, 21, 26, 29, 33, and 38.

24. The antibody of any of claims 11-23 in which at least one amino acid within a CDR is substituted by a corresponding residue of a corresponding CDR of another anti-MCSF antibody.

25. The antibody of any of claims 11-24 comprising a variable light chain amino acid sequence which is at least 65% homologous to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4.

26. The antibody of any of claims 11-25 comprising a variable heavy chain amino acid sequence which is at least 65% homologous to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2.

27. The antibody of any of claims 1-26 comprising a constant region of a

human antibody sequence and one or more heavy and light chain variable framework regions of a human antibody sequence.

28. The antibody of claim 27 wherein the human antibody sequence is an individual human sequence, a human consensus sequence, an individual human germline sequence, or a human consensus germline sequence.

29. The antibody of claim 27 that comprises a fragment of an IgG1 constant region.

30. The antibody of claim 29 that comprises a mutation in the IgG1 constant region that reduces antibody-dependent cellular cytotoxicity or complement dependent cytotoxicity activity.

31. The antibody of claim 27 that comprises a fragment of an IgG4 constant region.

32. The antibody of claim 31 that comprises a mutation in the IgG4 constant region that reduces formation of half-antibodies.

33. The antibody of any of claims 1-32, comprising a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence XVXLXEXGXXXXXXXXXLXLXCXVXDYSITSDYAWNWIXQXXXXXLXWMGYISY SGSTSXNXXLXXXIXIXRXXXXXXFXLXLXXVXXXDXAXYYCASFDYAHAMDYW GXGTXVXVXX, wherein X is any amino acid.

34. The antibody of any of claims 1-32, comprising a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence DVXLXEXGPXXVXPXXXLXLXCXVTDYSITSDYAWNWIRQXPXXKLEWMGYISYS GSTSYNPSLKXRIXIXRXTXXNXFXLXLXXVXXXDXATYYCASFDYAHAMDYWGX GTXVXVXX, wherein X is any amino acid.

35. The antibody of any of claims 1-32, comprising a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence XVQLQESGPGLVKPSQXLSLTCTVXDYSITSDYAWNWIRQFPGXXLEWMGYISYSGS TSYNPSLKSRIXIXRDTSKNQFXLQLNSVTXXDTAXYYCASFDYAHAMDYWGQGTX VTVSS, wherein X is any amino acid.

36. The antibody of any of claims 1-32, comprising a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence DVQLQESGPGLVKPSQXLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGXKLEWMGYISYSGS TSYNPSLKSRIXIXRDTSKNQFXLQLNSVTXXDTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTX VTVSS, wherein X is any amino acid.

37. The antibody of any of claims 1-32, comprising a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGS

TSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTV
TV
SS.

38. The antibody of any of claims 1-32, comprising a heavy chain variable region that comprises the amino acid sequence
QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGS
TSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTT
VTV
SS.

39. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence
XIXLXQXXXXXXVXXXXXVXFXCXAXQSIGTSIHWYXQXXXXXPXLLIKYASEXX
XXIXXXFXGXGXGXXFXLXIXXVXXXDXADYYCQQINSWPTTFGXGTXLXXXXX,
wherein X is any amino acid.

40. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence
XIXLXQXPXXLXVXPXXXVXFXCXASQSIGTSIHWYQQXTXXSPRLLIKYASEXISXI
PXRFXGXGXGXXFXLXIXXVXXXDXADYYCQQINSWPTTFGXGTXLXXXXX,
wherein X is any amino acid.

41. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence
XIXLTQSPXXLSVSPGERVXFSCRASQSIGTSIHWYQQXTXXXPRLLIKYASEXXXGIP
XRFSGSGSGTDFTLXIXXVESEDXADYYCQQINSWPTTFGXGTKLEIKRX, wherein X
is any amino acid.

42. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence
XIXLTQSPXXLSVSPGERVXFSCRASQSIGTSIHWYQQXTXXSPRLLIKYASEXISGIPX
RFSGSGSGTDFTLXIXXVESEDXADYYCQQINSWPTTFGXGTKLEIKRX, wherein X is
any amino acid.

43. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence
XIXLTQSPXXLSVSPGERVXFSCRASQSIGTSIHWYQQXTXXXPRLLIKYASESISGIPX
RFSGSGSGTDFTLXIXXVESEDXADYYCQQINSWPTTFGXGTKLEIKRX, wherein X is
any amino acid.

44. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence
EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASESISGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT.

45. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence
EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASERATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT.

46. The antibody of any of claims 1-32, comprising a light chain variable region that comprises the amino acid sequence EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASERISGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT.

47. The antibody of any of claims 33-46 wherein at least one X is the same as an amino acid at the same corresponding position in SEQ ID NOs: 2 or 4 using Kabat numbering.

48. The antibody of any of claims 33-46, wherein at least one X is a conservative substitution of an amino acid at the same corresponding position in SEQ ID NOs: 2 or 4 using Kabat numbering.

49. The antibody of any of claims 33-46, wherein at least one X is a non-conservative substitution of an amino acid at the same corresponding position in SEQ ID NOs: 2 or 4 using Kabat numbering.

50. The antibody of any of claims 33-46, wherein at least one X is an amino acid at the same corresponding position within a human antibody sequence, using Kabat numbering.

51. The antibody of any of claims 33-46, wherein at least one X is an amino acid at the same corresponding position within a human consensus antibody sequence, using Kabat numbering.

52. The antibody of claim 50 wherein the human antibody sequence is a human consensus sequence, human germline sequence, human consensus germline sequence, or any one of the human antibody sequences in Kabat.

53. The antibody of any of claims 1-32 comprising any one of the heavy chain sequences set forth in SEQ ID NOS: 114, 116, or 119.

54. The antibody of any of claims 1-32 comprising any one of the heavy chain variable region sequences set forth in SEQ ID NOS: 41 or 43.

55. The antibody of any of claims 1-32 comprising any one of the light chain sequences set forth in SEQ ID NOS: 45, 47, 48, 51, 53 or 136.

56. The antibody of claim 1 comprising the heavy chain sequence set forth in SEQ ID NO: 114 and the light chain sequence set forth in SEQ ID NO: 47.

57. The antibody of claim 1 comprising the heavy chain sequence set forth in SEQ ID NO: 116 and the light chain sequence set forth in SEQ ID NO: 47.

58. The antibody of claim 1 comprising the heavy chain sequence set forth in SEQ ID NO: 119 and the light chain sequence set forth in SEQ ID NO: 47.

59. The antibody of any of claims 33-46 comprising a variable heavy chain

amino acid sequence which is at least 65% identical to the variable heavy chain amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 41 or 43..

60. The antibody of claim 59 comprising a variable heavy chain amino acid sequence which is at least 80% identical to the variable heavy chain amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 41 or 43.

61. The antibody of any of claims 33-46 comprising a variable light chain amino acid sequence which is at least 65% identical to the variable light chain amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 45, 47, 48, 51, or 53.

62. The antibody of claim 61 comprising a variable light chain amino acid sequence which is at least 80% identical to the variable light chain amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 45, 47, 48, 51, or 53.

63. An antibody comprising a heavy chain as set forth in any one of claims 33-38, 53 or 59-60 and a light chain as set forth in any one of claims 39-46, 54 or 61-62.

64. The antibody of any of claims 12-63 that has an affinity Kd of at least 10^{-7}.

65. The antibody of claim 64 that has an affinity Kd of at least 10^{-9}.

66. An isolated nucleic acid comprising a nucleic acid sequence encoding a light chain of the antibody of any one of claims 1-65.

67. The isolated nucleic acid of claim 66 comprising a heavy chain nucleic acid sequence is at least 65% identical to the heavy chain nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NOs: 40 or 42.

68. The isolated nucleic acid of claim 67 comprising a heavy chain nucleic acid sequence is at least 80% identical to the heavy chain nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1or SEQ ID NOs: 40 or 42.

69. The isolated nucleic acid of claim 66 comprising a light chain nucleic acid sequence is at least 65% identical to the light chain nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NOs: 44, 46, 52, 135, or 137.

70. The isolated nucleic acid of claim 69 comprising a light chain nucleic acid sequence is at least 80% identical to the light chain nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NOs: 44, 46, 52, 135, or 137.

71. A vector comprising the isolated nucleic acid of any one of claims 66-70.

72. The vector of claim 71, wherein the isolated nucleic acid is operably linked to a regulatory control sequence.

73. A host cell comprising the vector of claim 72 or the nucleic acid of any one of claims 66-70.

74. A method of producing an antibody of any one of claims 1-65 comprising culturing a host cell of claim 73 such that the isolated nucleic acid is expressed to produce the antibody.

75. The method of claim 74, further comprising the step of recovering the antibody from the host cell culture.

76. An isolated antibody produced by the method of claim 75.

77. A hybridoma or host cell that secretes an antibody according to any one of claims 1-5.

78. An antibody of any of claims 1-65 or 76 that is conjugated to a toxin.

79. A pharmaceutical composition comprising any one of the antibodies of claims 1-65 or 76, and a pharmaceutically suitable carrier, excipient or diluent.

80. The pharmaceutical composition of claim 79 further comprising a second therapeutic agent.

81. The pharmaceutical composition of claim 80 wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent.

82. The pharmaceutical composition of claim 80 wherein the second therapeutic agent is a bisphosphonate.

83. The pharmaceutical composition of claim 82 wherein the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate.

84. The pharmaceutical composition of claim 80 wherein the second therapeutic agent is another antibody.

85. The antibody of any of claims 1-41 or 50 that binds to M-CSF for preventing a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis, wherein said antibody effectively reduces the severity of bone loss associated with the disease.

86. The antibody of any of claims 1-65 or 76 that binds to M-CSF for treating a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis, wherein said antibody effectively reduces the severity of bone loss associated with the disease.

87. The antibody according to claim 86 wherein said disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased

osteoclast activity, including endocrinopathies (including hypercortisolism, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidism), hypercalcemia, deficiency states (including rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (including malabsorption syndromes, chronic renal failure (including renal osteodystrophy), chronic liver disease (including hepatic osteodystrophy)), drugs (including glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (including osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

88. The antibody according to any one of claims 1-65 or 76 that binds to M-CSF for preventing or treating metastatic cancer to bone, wherein the metastatic cancer is breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia or lymphoma; head or neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, or cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; or skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

89. A method of preventing or reducing bone loss comprising administering to a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76, in an amount effective to prevent or reduce bone loss associated with the disease.

90. A method of treating a subject afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76, in an amount effective to reduce the severity of bone loss associated with the disease.

91. The method of claim 89 or 90 wherein said disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased osteoclast activity, including endocrinopathies (including hypercortisolism, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidism), hypercalcemia, deficiency states (including rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (including

malabsorption syndromes, chronic renal failure (including renal osteodystrophy), chronic liver disease (including hepatic osteodystrophy)), drugs (including glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (including osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

92. A method of preventing or treating metastatic cancer to bone, comprising administering to a subject afflicted with metastatic cancer a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1-65 or 76.

93. The method of claim 92 wherein the metastatic cancer is breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia or lymphoma; head or neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, or cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; or skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

94. A method of treating cancer comprising administering to a subject in need thereof therapeutically effective amounts of an antibody of any of claims 1-65 or 76.

95. The method of any of claims 89-94 further comprising administering a second therapeutic agent.

96. The method of claim 95 wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent.

97. The method of claim 95 wherein the second therapeutic agent is a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor.

98. The method of claims 95 wherein the second therapeutic agent is a bisphosphonate.

99. The method of claim 98 wherein the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate.

100. The method of 98 or 99 wherein the subject is precluded from receiving bisphosphonate treatment.

101. The method of any of claims 95-100 wherein the antibody is effective to reduce the dosage of second therapeutic agent required to achieve a therapeutic effect.

102. The method of any of claims 89-101 wherein said subject is a mammal.

103. The method of any of claims 89-101 wherein said antibody is administered in an amount effective to inhibit osteoclast proliferation and/or differentiation induced by tumor cells.

104. The method of any of claims 89-103 wherein the antibody is administered at a dose between about 2 μg/kg to 30 mg/kg body weight.

105. The method of claim 104 wherein the antibody is administered at a dose between about 0.1 mg/kg to 30 mg/kg body weight.

106. The method of claim 105 wherein the antibody is administered at a dose between about 0.1 mg/kg to 10 mg/kg body weight.

107. Use of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76 in the manufacture of a medicament for preventing or reducing bone loss in a patient exhibiting osteolysis.

108. Use of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76 in the manufacture of a medicament for treating a patient afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis.

109. The use of claim 108 wherein said disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased osteoclast activity, including endocrinopathies (including hypercortisolism, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidism), hypercalcemia, deficiency states (including rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (including malabsorption syndromes, chronic renal failure (including renal osteodystrophy), chronic liver disease (including hepatic osteodystrophy)), drugs (including glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (including osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

110. Use of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76 in the

72

manufacture of a medicament for preventing or treating metastatic cancer to bone in a patient suffering from metastatic cancer.

111. The use of claim 110 wherein the metastatic cancer is breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia or lymphoma; head or neck cancers; gastrointestinal cancers, including esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, or cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; or skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

112. Use of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76 in the manufacture of a medicament for treating a patient having cancer.

113. The use of any of claims 107-112 wherein said medicament is coordinated with treatment using a second therapeutic agent.

114. The use of claim 113 wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent.

115. The use of claim 113 wherein the second therapeutic agent is a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor.

116. The use of claim 113 wherein the second therapeutic agent is a bisphosphonate.

117. The use of claim 116 wherein the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate.

118. The use of claim 116 or 117 wherein the patient is precluded from receiving bisphosphonate treatment.

119. The use of any of claims 107-112 wherein said patient has been pre-treated with the second therapeutic agent.

120. The use of claim 119 wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent.

121. The use of claim 119 wherein the second therapeutic agent is a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor.

122. The use of claim 119 wherein the second therapeutic agent is a bisphosphonate.

123. The use of claim 122 wherein the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate.

124. The use of claim 122 or 123 wherein the patient is precluded from receiving bisphosphonate treatment.

125. The use of a synergistic combination of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76 for preparation of a medicament for treating a patient exhibiting osteolysis wherein said medicament is coordinated with treatment using a second therapeutic agent.

126. The use of claim 125 wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent.

127. The use of claim 125 wherein the second therapeutic agent is a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor.

128. The use of claim 125 wherein the second therapeutic agent is a bisphosphonate.

129. The use of claim 125 wherein the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate.

130. The use of claim 128 or 129 wherein the patient is precluded from receiving bisphosphonate treatment.

131. The use of any of claims 113-130 wherein the amount of antibody in the medicament is at a dose effective to reduce the dosage of second therapeutic agent required to achieve a therapeutic effect.

132. The use of any of claims 107-139 wherein the amount of antibody in the medicament is effective to inhibit osteoclast proliferation and/or differentiation induced by tumor cells.

133. The use of any of claims 89-103 wherein the amount of antibody in the medicament is at a dose between about 2 μg/kg to 30 mg/kg body weight.

134. The use of claim 104 wherein the the amount of antibody in the medicament is at a dose between about 0.1 mg/kg to 30 mg/kg body weight.

135. The use of claim 105 wherein the amount of antibody in the medicament is at a dose between about 0.1 mg/kg to 10 mg/kg body weight.

136. A kit comprising a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to prevent or reduce bone loss.

137. A kit comprising a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to a patient afflicted with a disease that causes or contributes to osteolysis.

138. The kit of claim 137 wherein said disease is selected from the group consisting of metabolic bone diseases associated with relatively increased osteoclast activity, including endocrinopathies (including hypercortisolism, hypogonadism, primary or secondary hyperparathyroidism, hyperthyroidism), hypercalcemia, deficiency states (including rickets/osteomalacia, scurvy, malnutrition), chronic diseases (including malabsorption syndromes, chronic renal failure (including renal osteodystrophy), chronic liver disease (including hepatic osteodystrophy)), drugs (including glucocorticoids (glucocorticoid-induced osteoporosis), heparin, alcohol), and hereditary diseases (including osteogenesis imperfecta, homocystinuria), cancer, osteoporosis, osteopetrosis, inflammation of bone associated with arthritis and rheumatoid arthritis, periodontal disease, fibrous dysplasia, and/or Paget's disease.

139. A kit comprising a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to prevent or treat metastatic cancer to bone.

140. The kit of claim 139 wherein the metastatic cancer is breast, lung, renal, multiple myeloma, thyroid, prostate, adenocarcinoma, blood cell malignancies, including leukemia or lymphoma; head or neck cancers; gastrointestinal cancers, including

esophageal cancer, stomach cancer, colon cancer, intestinal cancer, colorectal cancer, rectal cancer, pancreatic cancer, liver cancer, cancer of the bile duct or gall bladder; malignancies of the female genital tract, including ovarian carcinoma, uterine endometrial cancers, vaginal cancer, or cervical cancer; bladder cancer; brain cancer, including neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; or skin cancer, including malignant melanoma or squamous cell cancer.

141. A kit comprising a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 through 65 or 76, packaged in a container, such as a vial or bottle, and further comprising a label attached to or packaged with the container, the label describing the contents of the container and providing indications and/or instructions regarding use of the contents of the container to treat cancer.

142. The kit of any of claims 136-141 further comprising a second therapeutic agent.

143. The kit of claim 142 wherein the second therapeutic agent is a cancer chemotherapeutic agent.

144. The kit of claim 142 wherein the second therapeutic agent is a non-M-CSF colony stimulating factor, or anti-RANKL antibody, or soluble RANKL receptor.

145. The kit of claims 142 wherein the second therapeutic agent is a bisphosphonate.

146. The kit of claim 145 wherein the bisphonate is zeledronate, pamidronate, clodronate, etidronate, tilundronate, alendronate, or ibandronate.

147. The kit of any of claims 136-146 including instructions to treat a patient precluded from receiving bisphosphonate treatment.

148. The kit of any of claims 136-147 comprising a dose of antibody effective to reduce the dosage of second therapeutic agent required to achieve a therapeutic effect.

149. The kit of any of claims 136-147 comprising a synergistic dose of antibody.

150. The kit of any of claims 136-147 comprising a dose of antibody effective to inhibit osteoclast proliferation and/or differentiation induced by tumor cells.

151. The kit of any of claims 136-147 comprising a dose of antibody

74

between about 2 μg/kg to 30 mg/kg body weight.

152. The kit of claim 151 comprising a dose of antibody between about 0.1 mg/kg to 30 mg/kg body weight.

153. The kit of claim 152 comprising a dose of antibody between about 0.1 mg/kg to 10 mg/kg body weight.

154. A method of screening for an M-CSF-specific antibody comprising the steps of

a) contacting metastatic tumor cell medium, osteoclasts and a candidate antibody;

b) detecting osteoclast formation, proliferation and/or differentiation; and

c) identifying said candidate antibody as an M-CSF-specific antibody if a decrease in osteoclast formation, proliferation and/or differentiation is detected.

155. The method of screening according to claim 154 wherein said metastatic tumor cell medium includes tumor cells.

156. The method of screening according to claim 154 wherein the contacting step (a) occurs in vivo, said detecting step (b) comprises detecting size and/or number of bone metastases, and the candidate antibody is identified as an M-CSF-specific antibody if a decrease in size and/or number of bone metastases is detected.

157. The method of screening according to claims 154-156 further comprising the step of determining if the candidate antibody binds to M-CSF.

158. The method of screening according to claims 154-157 further comprising the step of determining if said candidate antibody inhibits interaction between M-CSF and its receptor M-CSFR.

159. A method of identifying an M-CSF-specific antibody that can prevent or treat metastatic cancer to bone comprising the steps of:

(a) detecting binding of a candidate antibody to an epitope of M-CSF that includes at least 4 contiguous residues of SEQ ID NOs: 120 or 121; and

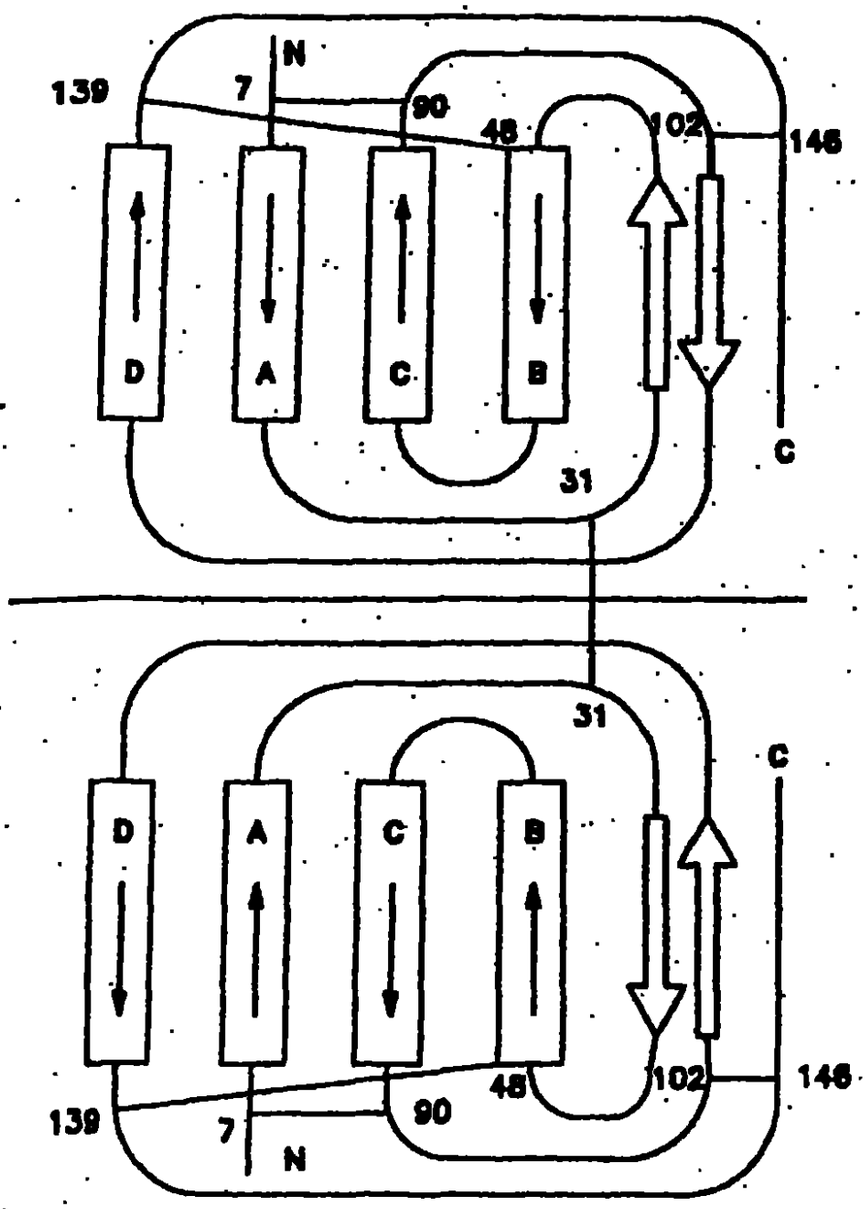
(b) assaying the ability of said candidate antibody to prevent or treat metastatic cancer to bone *in vitro* or *in vivo*.

160. A method of systematically altering up to 60% of the heavy chain amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 is provided comprising altering any X in the amino acid sequence XVXLXEXGXXXXXXXXXLXLXCXVXDYSITSDYAWNWIXQXXXXXLXWMGYISY SGSTSXNXXLXXXIXIXRXXXXXXFXLXLXXVXXXDXAXYYCASFDYAHAMDYW GXGTXVXVXX, and testing an antibody comprising the altered amino acid sequence for binding to an epitope of M-CSF that includes at least 4 contiguous amino acids of SEQ ID NOS: 120 or 121.

161. A method of systematically altering up to 60% of the light chain amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4 is provided comprising altering any X in the amino acid sequence XIXLXQXXXXXXVXXXXXVXFXCXAXQSIGTSIHWYXQXXXXXPXLLIKYASEXX XXIXXXFXGXGXGXXFXLXIXXVXXXDXADYYCQQINSWPTTFGXGTXLXXXXX, and testing an antibody comprising the altered amino acid sequence for binding to an epitope of M-CSF that includes at least 4 contiguous amino acids of SEQ ID NOS: 120 or 121.

75

FIG. 1



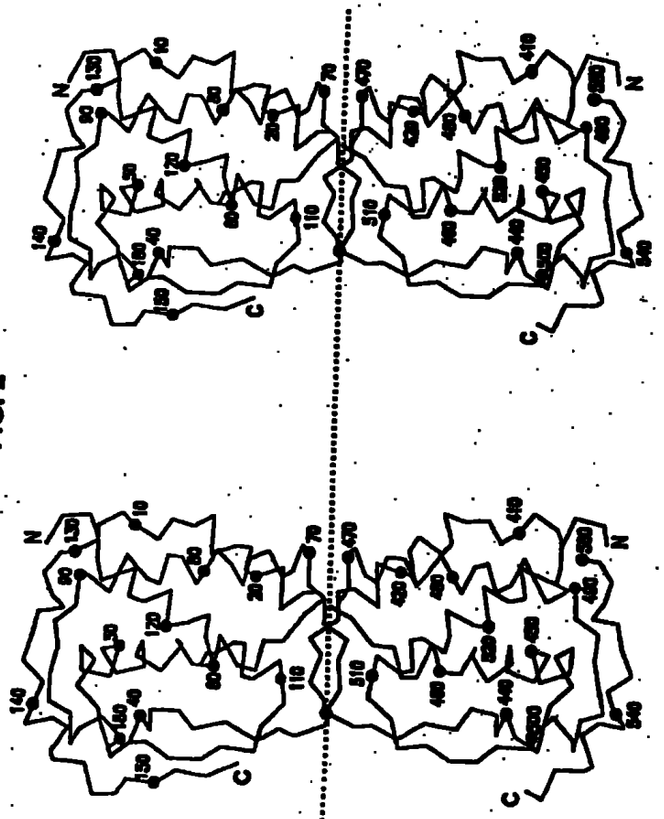


FIG. 2

FIG. 3

Osteoclast number
120
100
80
60
40
20
0
CSF-1 (30ng/ml) + RANKL (100 ng/ml)
MDA-231 CM + RANKL (100 ng/ml)
MCF-7 CM + RANKL (100 ng/ml)

Fig. 4A

RX1 Light chain amino acid sequence:

1 2 3

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPTTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSE
QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

RX1 Heavy Chain amino acid sequence:

4 5 6

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAMDYWGQGTSVTVSSAKTTP
PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP
KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPpEEEMTKKQVTLTCM
VTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHhttKSFSRTPG

RX1 heavy chain nucleotide sequence:

atgggttggtcctgtatcatcctattcctggtggccactgccacaggtgtgcactccgacgtgcagcttcaggagtcaggacctggcctcgtgaaaccttctcagagtctgtccctcacctgt
actgtcactgactactccatcaccagtgattacgcctggaactggatacggcaattcccagggaataaacttgagtggatggggtacataagctacagtggtagcacttcctacaatccatct
ctcaaaagtcggatctccatcactcgagacacatccaagaaccagttcttcctgcagctgaactctgtgactactgaggacacagccacatattactgtgcatccttcgactatgcccacgcc
atggattactggggccaagggacttcggtcactgtctcttccgccaaaacaacagccccatcggtctatccactggcccctgtgtgtggagatacaactggctcctcggtgactctaggatgc
ctggtcaagggttatttccctgagccagtgaccttgacctggaactctggatccctgtccagtggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtctgaccctctacaccctcagcagctcagtg
actgtaacctcgagcacctggcccagccagtccatcaccctgcaatgtggcccacccggcaagcagcaccaaggtggacaagaaaattgagcccagagggcccacaatcaagccctgtcctcca
tgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtcttcatcttccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgtgtggtggtggatgtgagc
gaggatgacccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacccatagaggaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgccctccccatc
cagcaccaggactggatgagtggcaaggagttcaaatgcaaggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaaccatctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatat
gtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaac
tacaagaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggt
ctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccggactccgggtaaa

RX1 light chain nucleotide sequence:

atggtatccacacctcagttccttgtatttttgctttctggattccagcctccagaggtgacatcttgctgactcagtctccagccatcctgtctgtgagtccaggagaaagagtcagtttc
tcctgcagggccagtcagagcattggcacaagcatacactggtatcagcaaagaacaaatggttctccaaggcttctcataaagtatgcttctgagtctatctctgggatcccttccaggttt
agtggcagtggatcagggacagatttactcttagcatcaacagtgtggagtctgaagatattgcagattattactgtcaacaaattaatagctggccaaccacgttcggcgggggacaaag
ttggaaataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttcttgaacaacttctacccccaaagacatc
aatgtcaagtggaagattgatggcagtgaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgag
tatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcacccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtgt

WO 2005/068503 PCT/US2005/000546

FIG. 4B

CHIR-R1X Light Chain Risk Assignments

V-Region	Amino Acids 1-52
Risk	LHLHLHLMLLMLHLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHMHLMLLMHMHHHHHHH
Mouse	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS

V-Region	Amino Acids 53-109
Risk	HLMMLHMLMHLHLHLHLLLHLHLHLLHLLLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLLLLLL
Mouse	ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA

FIG. 4C

CHIR-RX1Heavy Chain Risk Assignments

V-Region	Amino Acids 1-57
Risk	MHLHLHLHMLLMLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHHMHLMLLMHMHHHHHHHHHHHHHHH
Mouse	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMGYIS---YSGST

V-Region	Amino Acids 58-113
Risk	HMHMMHMLMHLHLHLMLLMLHLHLHLLHLLLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLHLL
Mouse	SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTSVTVSS

81

FIG. 5A

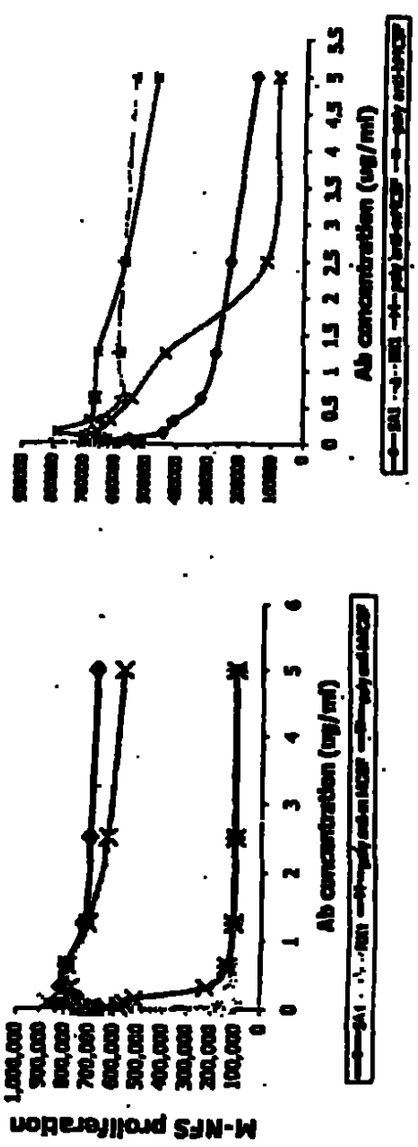
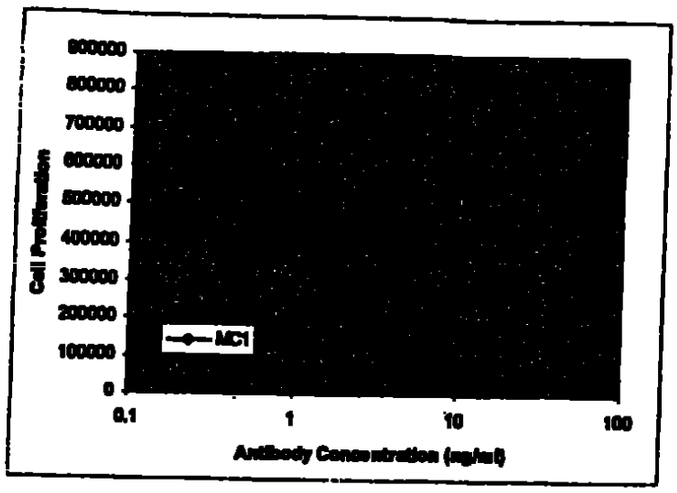
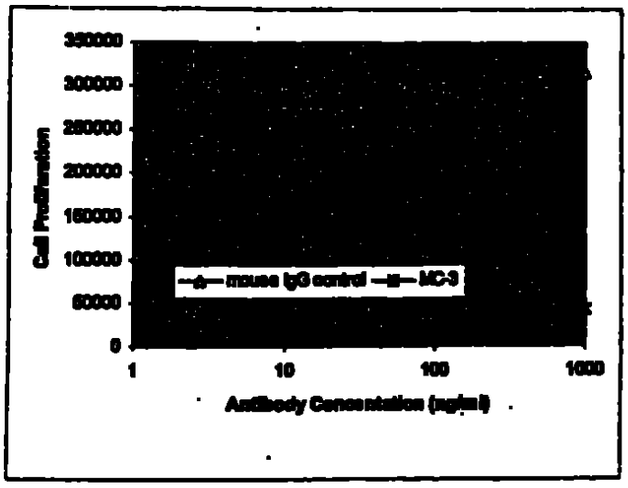

M-NFS proliferation
Ab concentration (ug/ml)
Ab concentration (ug/ml)

FIG. 5B

MC1 Neutralizes human MCSF activity



MC3 Neutralizes human MCSF activity



83

Fig. 6

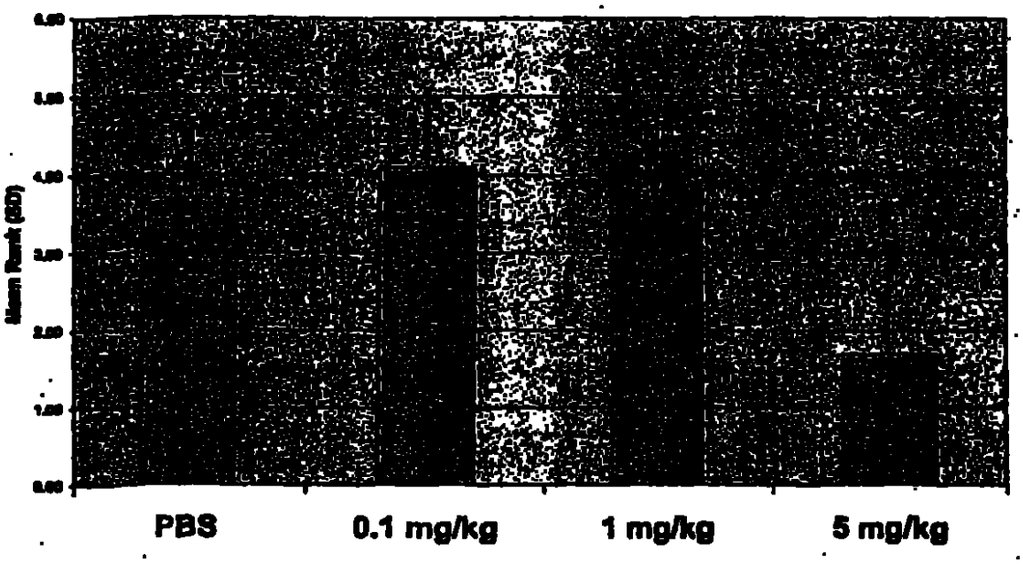


Fig. 7

Number of Mets per Mouse
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
PBS
0.1 mg/kg
1.0 mg/kg
5.0 mg/kg

85

FIG. 8A

Binding of MCSF-specific antibody to breast cancer cell line MDA231

Red: no antibody control
Black: M-CSF antibody 1 ug/ml
Green: M-CSF antibody 10 ug/ml
Blue: M-CSF antibody 50 ug/ml

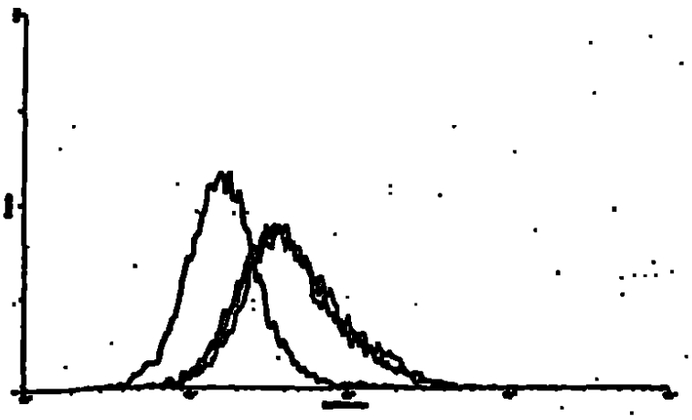


FIG. 8B

Binding of MCSF-specific antibody to multiple myeloma cancer cell line ARH77

Red: no antibody control
Green: M-CSF antibody 5 ug/ml
Blue: control IgG2a 5 ug/ml

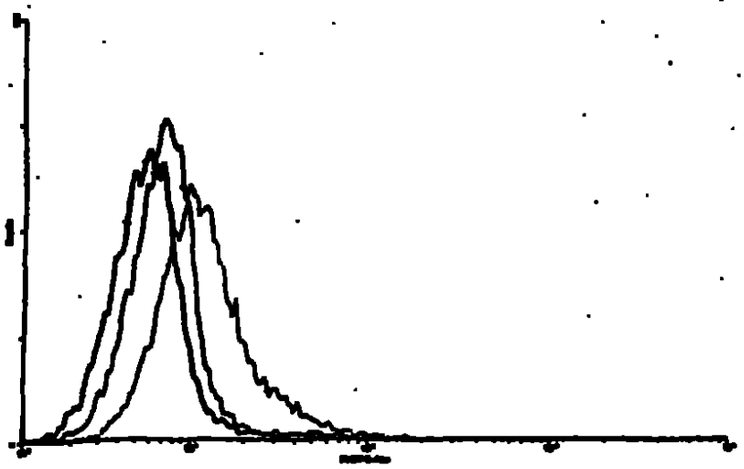


FIG. 9

Cancer Type	Cancer Status	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4	% with scores 3 or higher
adrenal	normal	10	5	5	0	0	0
basal cell	cancer	5	0	0	0	0	0
bladder	normal	8	1	2	1	0	10
brain	normal	17	1	2	0	0	0
breast	cancer	6	5	13	62	0	72
breast	normal	7	8	7	6	0	24
carcinoids	cancer	9	2	2	0	0	0
carcinoids (muscle)	cancer	1	0	1	0	0	0
choriocarcinoma	cancer	1	0	0	0	0	0
colon	normal	4	0	2	0	0	0
colon	cancer	9	0	1	4	0	27
fibrosarcoma	cancer	3	1	0	0	0	0
gallbladder	normal	2	1	0	1	0	25
germ cell	cancer	1	0	0	0	0	0
heart	normal	7	3	2	4	0	29
kidney	normal	5	10	1	4	0	30
kidney	cancer	5	1	0	3	0	33
leiomyosarcoma	cancer	5	0	0	0	0	0
liver	normal	11	3	4	1	0	8
liver	cancer	5	3	0	3	0	27
lung	normal	19	0	1	0	0	0
lung	cancer	3	1	0	3	0	43
lymphoma	cancer	13	0	3	2	0	13
melanoma	cancer	7	0	2	5	0	38
melanoma(inflammation)	cancer	0	0	0	1	0	100
mesothelioma	cancer	9	0	0	0	0	0
neuroblastoma	cancer	1	0	0	0	0	0
ovary	normal	6	0	2	0	0	0
ovary	cancer	6	2	0	4	0	29
pancreas	normal	9	2	5	4	0	29
pancreas	cancer	5	1	0	3	0	33
prostate	normal	6	3	5	3	0	21
prostate	cancer	9	1	1	4	0	27
sarcoma all	cancer	6	0	2	2	0	25
sarcoma	cancer	3	0	2	1	0	17
sarcoma (kidney)	cancer	3	0	2	1	0	17
sarcoma rab	cancer	2	0	0	0	0	0
seminoma	cancer	3	0	0	0	0	0
small intestine	normal	2	1	0	1	0	25
spleen	normal	14	2	3	0	0	0
squamous cell	cancer	3	0	0	0	0	0
stomach	normal	3	2	2	1	0	13
stomach	cancer	7	1	1	1	0	10
teratoma	cancer	1	0	0	0	0	0
testis	normal	6	1	3	3	0	25
thyroid	normal	16	0	0	0	0	0
thyroid	cancer	6	2	1	2	0	18
undiff all	cancer	6	0	2	1	0	11
undif	cancer	5	0	2	0	0	0

87

Fig. 10

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95

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

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175

Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
        195                 200                 205

Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
    210                 215                 220

Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240

Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
                245                 250                 255
```

Fig. 11

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
            100                 105                 110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175
Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
            180                 185                 190
Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
        195                 200                 205
Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
    210                 215                 220
Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240
Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
                245                 250                 255
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
            260                 265                 270
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
        275                 280                 285
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
    290                 295                 300
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305                 310                 315                 320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
                325                 330                 335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
            340                 345                 350
Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
        355                 360                 365
Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
    370                 375                 380
Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
385                 390                 395                 400
Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
                405                 410                 415
Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
            420                 425                 430
Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
        435                 440                 445
Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
    450                 455                 460
Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
465                 470                 475                 480
His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
                485                 490                 495
Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
            500                 505                 510
Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
        515                 520                 525
Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
    530                 535                 540
Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
```

Fig. 12

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
            100                 105                 110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175
Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
            180                 185                 190
Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
        195                 200                 205
Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
    210                 215                 220
Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240
Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
                245                 250                 255
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
            260                 265                 270
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
        275                 280                 285
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
    290                 295                 300
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305                 310                 315                 320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
                325                 330                 335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
            340                 345                 350
Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
        355                 360                 365
Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
    370                 375                 380
Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
385                 390                 395                 400
Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
                405                 410                 415
Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
            420                 425                 430
Gln Val Glu Leu Pro Val
```

90

FIG. 13

5H4 heavy chain protein sequence:

```
  1   EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT GYYMNWVKQS HGKSLEWIGY
 51   ISCYNGDTNY NQNFKGKATF TVDTSSSTAY MQFNSLTSED SAVYYCARRG
101   GNYPAYWGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV TLGCLVKGYF
151   PEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVPSS TWPSETVTCN
201   VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLTITLT
251   PKVTCVVVDI SKDDPEVQFS WFVDDVEVHT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL
301   PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE
351   QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ PAENYKNTQP IMDTDGSYFV
401   YSKLNVQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNHH TEKSLSHSPG K
```

5H4 light chain protein sequence:

```
  1   DIVMTQSHKF MSTSVGDRVT ITCKASQNVG TAVTWYQQKP GQSPKLLIYW
 51   TSTRHAGVPD RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFCQQ YSSYPLTFGA
101   GTKLELKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
151   DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201   STSPIVKSFN RNEC
```

FIG. 14

MC-1 heavy chain protein sequence:

```
  1   EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSGFTFS DYYMYWVRQT PEKRLEWVAY
 51   ISNGGGSTYY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSRLKSED TAMYYCARQG
101   SYGYPFAYWG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG
151   YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT
201   CNVAHPASST KVDKKIEPRG PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK
251   DVLMISLSPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS
301   TLRVVSALPI QHQDWMSGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPQV
351   YVLPPPEEEM TKKQVTLTCM VTDFMPEDIY VEWTNNGKTE LNYKNTEPVL
401   DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KSFSRTPGK
```

MC-1 light chain protein sequence:

```
  1   AIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCSASQGIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
 51   TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYCQQ YSKLPWTFGG
101   GTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
151   DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201   STSPIVKSFN RNEC
```

92

FIG. 15

MC-3 heavy chain protein sequence:

```
  1   DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG
 51   YISYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNQFF LQLNSVTTED TATYYCARLX
101   TWLFDYWGQG TTLTVSSAKT TPPSVYPLAP GCGDTTGSSV TLGCLVKGYF
151   PESVTVTWNS GSLSSSVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQTVTCS
201   VAHPASSTTV DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP
251   PNIKDVLMIS LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWFVNNVEV HTAQTQTHRE
301   DYNSTIRVVS TLPIQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKGLVR
351   APQVYILPPP AEQLSRKDVS LTCLVVGFNP GDISVEWTSN GHTEENYKDT
401   APVLDSDGSY FIYSKLNMKT SKWEKTDSFS CNVRHEGLKN YYLKKTISRS
451   PGLDLDDICA EAKDGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF
501   SSVVELKQKI SPDYRNMIGQ GA
```

MC-3 light chain protein sequence:

```
  1   DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQQRT NGSPRLLIKY
 51   ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWPTTFGG
101   GTKLEIKWAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
151   DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201   STSPIVKSFN RNEC
```

93

FIG. 16A

For heavy chain CDR1:

```
                    1
     H_CDR1_5H4  (1) -G[redacted]FMH
     H_CDR1_MC-1 (1) -[redacted]YMY
H_CDR1_CHIR-RX1  (1) [redacted]
     H_CDR1_MC-3 (1) [redacted]
       Consensus (1) SDYAWN
```

For heavy chain CDR2:

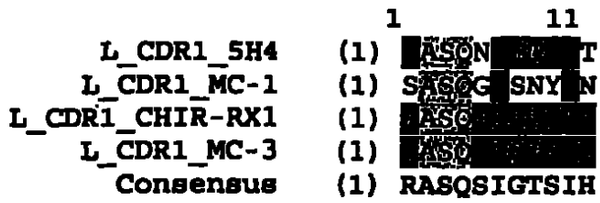
```
                    1                   17
     H_CDR2_5H4  (1) [redacted]
     H_CDR2_MC-1 (1) [redacted]
H_CDR2_CHIR-RX1  (1) [redacted]
     H_CDR2_MC-3 (1) [redacted]
       Consensus (1) YIS YSGSTSYNPSLKS
```

For heavy chain CDR3:

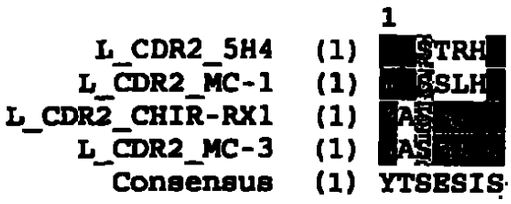
```
                    1
     H_CDR3_5H4  (1) --[redacted]
     H_CDR3_MC-1 (1) QGS[redacted]
H_CDR3_CHIR-RX1  (1) -F[redacted]
     H_CDR3_MC-3 (1) --LET[redacted]
       Consensus (1)   DYGW FDY
```

FIG. 16B

For light chain CDR1:



For light chain CDR2:



For light chain CDR3:

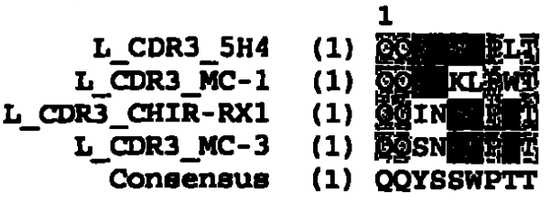


FIG. 17

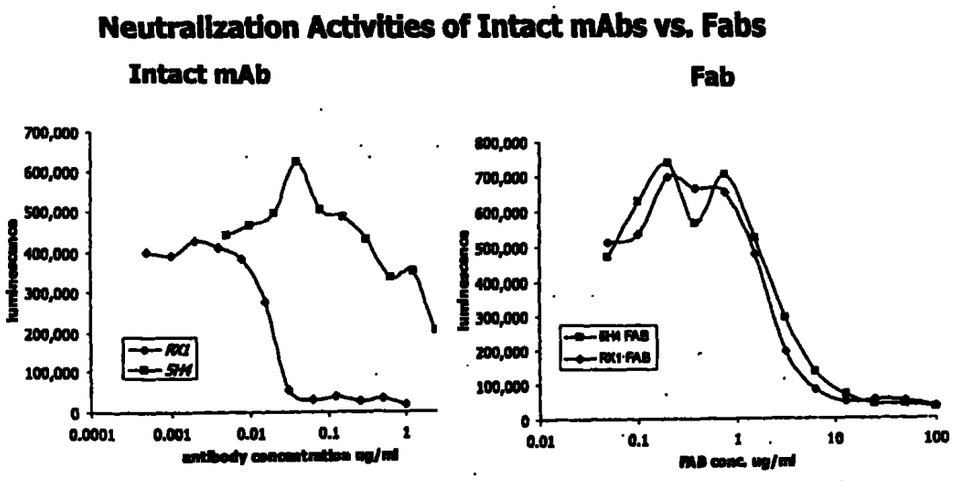

Neutralization Activities of Intact mAbs vs. Fabs
Intact mAb
Fab
luminescence
700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
antibody concentration ug/ml
RKI
SHI
luminescence
800,000
700,000
600,000
500,000
400,000
300,000
200,000
100,000
0
0.01
0.1
1
10
100
FAB conc. ug/ml
SHI FAB
RKI-FAB

FIG. 18

MCSF Structure with RX1 Epitopes Highlighted



R_{98}FRDNTPN$_{105}$

I_{65}TFEFVDQE$_{73}$

I_{65}TFEFVDQE$_{73}$

F_{138}YETPLQ$_{144}$

FIG. 19A

Heavy Chain

V-Region	No.of Changes	Amino Acids 1-57
Risk		MHLHLHLHMLLMLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHMHLMLLMHMHHHHHHHHHHHHHHH
Mouse		DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMGYIS---YSGST
Human		qvqLqesGpgLVkPsqTLsLTCxvsGxsxSsxxxxxxWiRQpPgkgLEWigxiyyraxxgxt
Low Risk	2	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGKKLEWMGYIS---YSGST
Low+Mod	5	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWN-WIRQFPGKGLEWMGYIS---YSGST

V-Regi n	No.of Changes	Amino Acids 58-113
Risk		HMHMMHMLMHLHLHLMLLMLHLHLHLLLHLLLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLHLL
Mouse		SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTSVTVSS
Human		xynpSlksRvTisvDTSKNQfsLxlxsvtaaDTAvYyCArxxxxxxxxxxxxxxxxxfdxWGqGtxVTVSS
Low Risk	6	SYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTTVTVSS
Low+Mod	7	SYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTTVTVSS

FIG. 19B

Low Risk Heavy Chain Vs. Kabat Vh2 Consensus:

Protein Seq:

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMD
YWGQGTTVTVSS

DNA Seq:

GACGTACAACTTCAAGAATCTGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTACGCTT
GGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCTCCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCAC
AATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATTCTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACG
CCATGGATTATTGGGGACAGGGTACTACCGTTACCGTAAGCTCA

Low Risk + Moderate Risk Heavy Chain Vs. Kabat Vh2 Consensus:

Protein Seq:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMD
YWGQGTTVTVSS

DNA Seq:

CAAGTTCAACTTCAAGAATCAGGCCCCGGACTCGTTAAACCCTCTCAAACTCTCTCTCTTACTTGCACTGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTACGCTTG
GAACTGGATCAGACAATTTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGATGGGATATATCTCTTACTCTGGCTCAACCTCTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAAC
AATCTCACGCGATACTTCTAAAAATCAATTCTCACTTCAACTTAACTCCGTTACTGCCGCCGACACTGCCGTTTACTACTGTGCTTCCTTCGATTACGCCCACG
CTATGGATTATTGGGGACAAGGAACTACCGTCACTGTCAGCTCA

FIG. 20A

Light Chain

V-Region	No.of Changes	Amino Acids 1-52
Risk		LHLHLHLMLLMLHLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHMHLMLLMHMHHHHHHH
Mouse		DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS
Human		EIVlTQSPgTLSlSPGERaTLSCRASQSvsssyL---AWYQQkPGQAPRLLIYgAS
Low Risk	8	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQKTGQSPRLLIKYAS
L w+Mod	9	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQKTGQAPRLLIKYAS

V-Region	No.of Changes	Amino Acids 53-109
Risk		HLMMLHMLMHLHLHLHLLHLHLHLLHLLLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLLLLLL
Mouse		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA
Human		sRATGIPdRFSGSGSGTDFTLTISrLepEDFAVYYCQQygsspp-----xTFGqGTKvEI-KRT
Low Risk	8	ERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT
Low+Mod	10	ERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT

Fig

FIG. 20B

Low Risk Light Chain Vs. Kabat Vk3 Consensus:

Protein Seq:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

Nucleotide Seq:

GAAATAGTCCTTACCCAATCTCCCCGGAACCCTCTCAGTATCTCCCCGGCGAACGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAATCCATCGGCACTTCAATTCACT
GGTATCAGCAGAAAACAGGTCAATCCCCACGGCTTCTTATAAAATATGCATCAGAAAGAATATCAGGCATTCCAGACAGATTCTCAGGTTCAGGTTCAGGC
ACAGACTTCACACTTACAATTTCCCGCGTCGAATCCGAAGACTTCGCTGACTATTACTGCCAACAAATCAACTCATGGCCTACTACTTTCGGTCAAGGCACC
AAACTCGAAATTAAACGTACG

Low Risk + Moderate Risk Light Chain Vs. Kabat Vk3 Consensus:

Protein Seq:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

Nucleotide Seq:

GAAATAGTTCTTACTCAATCCCCCGGTACACTCTCAGTTTCCCCAGGCGAACGCGTCACTTTTTCTTGCAGAGCATCACAATCAATCGGCACTTCAATTCATT
GGTATCAACAAAAAACAGGACAGGCCCCACGACTTCTTATTAAATATGCATCAGAACGAGCCACAGGCATCCCAGACAGATTTTCAGGTTCAGGATCAGGC
ACCGATTTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACA
AAACTCGAAATTAAACGTACG

FIG. 21A

Light Chain – Changes back to Murine

V-Region	No.of Changes	Amino Acids 1-52
Risk		LHLHLHLMLLMLHLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHMHLMLLMHMHHHHHH
Mouse		DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS
Human		EIVlTQSPgTLSlSPGERaTLSCRASQSvsssyL---AWYQQkPGQAPRLLIYgAS
Low Risk	8	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQKTGQSPRLLIKYAS
Low+Mod	9	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQKTGQAPRLLIKYAS

V-Region	No.of Changes	Amino Acids 53-109
Risk		HLMMLHMLMHLHLHLHLLHLHLHLLHLLLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLLLLLL
M use		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA
Human		sRATGIPdRFSGSGSGTDFTLTISrLepEDFAVYYCQQygsspp-----xTFGqGTKvEI-KRT
Low Risk	8	ERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTIsRVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT
Low+Mod	10	ERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIsRVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT
Low+Mod Altnernate	7	ESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTIsRVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT

FIG. 21B

Low Risk Light Chain Vs. Kabat Vk3 Consensus; AA54 changed back to murine:

Protein Seq:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

Nucleotide Seq:

GAAATAGTCCTTACCCAATCTCCCCGGAACCCTCTCAGTATCTCCCGGCGAACGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAATCCATCGGCACTTCAATTCACT
GGTATCAGCAGAAAACAGGTCAATCCCCACGGCTTCTTATAAAATATGCATCAGAATCAATTTCTGGCATCCCAGACAGATTTTCAGGTTCAGGATCAGGCA
CCGATTTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACAA
AACTCGAAATTAAACGTACG

Low Risk + Moderate Risk Light Chain Vs. Kabat Vk3 Consensus; AA54, 55, 56 changed back to murine:

Protein Seq:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

Nucleotide Seq:

GAAATAGTTCTTACTCAATCCCCCGGTACACTCTCAGTTTCCCCAGGCGAACGCGTCACTTTTTCTTGCAGAGCATCACAATCAATCGGCACTTCAATTCATT
GGTATCAACAAAAAACAGGACAGGCCCCACGACTTCTTATTAAATATGCATCAGAATCAATTTCTGGCATCCCAGACAGATTTTCAGGTTCAGGATCAGGCA
CCGATTTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACAA
AACTCGAAATTAAACGTACG

FIG. 22A

Light Chain – Changes based on HK6 2-1-1(A14)

V-Region	No.of Changes	Amino Acids 1-52
Risk		LHLHLHLMLLMLHLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHMHLMLLMHMHHHHHH
M use		DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS
Human		DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCQASEGIGNYLY----WYQQKPDQAPKLLIKYAS
Low Risk	10	DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIH----WYQQKTDQSPRLLIKYAS
Low+Mod	12	DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIH----WYQQKTDQAPKLLIKYAS

V-Region	No.of Changes	Amino Acids 53-109
Risk		HLMMLHMLMHLHLHLHLLHLHLHLLHLLLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLLLLLL
Mouse		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA
Human		QSISGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQGNKHP------LTFGGGTKVEI-KRT
Low Risk	5	ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRT
Low+Mod	5	ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRT

WO 2005/068503 29/44 PCT/US2005/000546

FIG. 22B

Low Risk Light Chain vs. VK6 Subgroup 2-1-(1) A14:

Protein Seq:

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIHWYQQKTDQSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQINSWPTTFGGGTKLEIKRT

Nucleotide Seq: Not synthesized

Low Risk + Moderate Risk Light Chain vs. VK6 Subgroup 2-1-(1) A14:

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIHWYQQKTDQAPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQI
NSWPTTFGGGTKLEIKRT

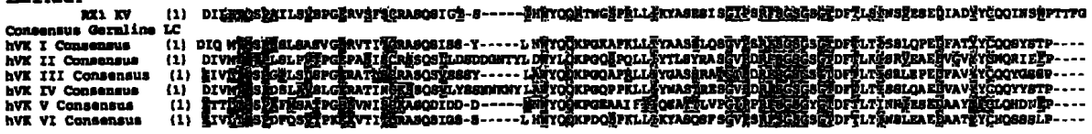
Nucleotide Seq:

GACATAGTTCTCACACAATCACCAGCATTCCTCTCAGTTACACCCGGCGAAAAAGTAACCTTTACCTGTCAGGCTTCTCAATCTATCGGCACTTCTATTCACT
GGTATCAACAAAAAACCGATCAAGCTCCTAAACTCCTCATAAAATACGCATCCGAATCCATCTCCGGTATCCCCTCCAGATTTTCAGGCTCCGGCTCCGGCA
CAGATTTCACCCTTACCATTAGCTCAGTTGAAGCCGAAGACGCAGCTGATTACTACTGTCAACAAATAAACTCATGGCCCACTACTTTCGGCGGCGGCACTA
AACTCGAAATAAAACGTACG

FIG. 23A

Murine RX-1 Light Chain:

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPTTFGGGTK
LEIKRA



LIGHT CHAIN amino half

RX-1 DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSI--GTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS

pos… 10 20 abcdef 30 40 50

Kabat:

HK1_DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSLVXX-XISXXLXWYQQKPGKAPKLLIYXAS
HK2_DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSXDGXXYLNWYLQKPGQSPQLLIYXXS
HK3_EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS-----VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS
HK4_DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS

Germline Consensus (with JK4):

hVK1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS------ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS
hVK2 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLS
hVK3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS-----VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS
hVK4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
hVK5 ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDD------DMNWYQQKPGEAAIFIIQEAT
hVK6 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIG------SSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS

FIG. 23B

LIGHT CHAIN carboxy half

```
RX-1  ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA

pos...      60        70        80        90      abcdef  100       a

Kabat:

HK1...XLXSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQXXXXPE-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK2...NRXSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAXQXPR-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK3...SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPP-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK4...TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP------XTFGQGTKVEI-KRT

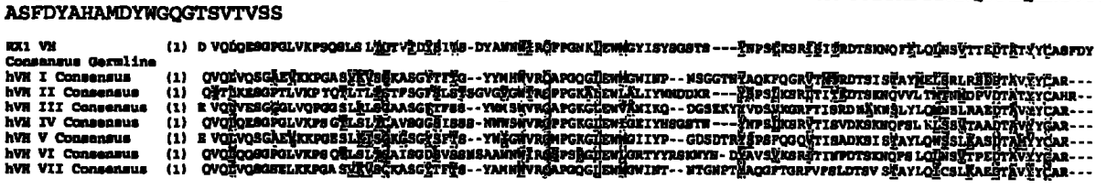
Germline Consensus (with JK4):

hVK1  SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK2  YRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK3  SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK4  TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK5  TLVPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK6  QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP------LTFGGGTKVEI-KRT
```

107

FIG. 24A

Murine RX-1 Heavy Chain:
DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYC
ASFDYAHAMDYWGQGTSVTVSS



HEAVY CHAIN amino half

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMGYIS---YSGST

pos ... 10 20 30 ab 40 50 abc

Kabat:

HH1 ...XVQLVQSGAEVKKPGXSVKVSCKASGYTFXSYXIX--WVRQAPGQGLEWMGXIXPY-XXGXT
HH2 ...QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCKVSGXSXSSXXXXXXWIRQPPGKGLEWIGXIYYRAXKGXT
HH3 ...EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXYXMX--WVRQAPGKGLEWVXXIXXKXXGXXT

Germline Consensus (with JH4):
hVHI QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMH--WVRQAPGQGLEWMGWINP--NSGGT
hVHII QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALIY---WNDDK
hVHIII EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS--WVRQAPGKGLEWVANIK--QDGSEK
hVHIV QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGGSISSSNWW-SWVRQPPGKGLEWIGEIY---HSGST
hVHV EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG--WVRQMPGKGLEWMGIIYP--GDSDT
hVHVI QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY-RSKWYN
hVHVII QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMN--WVRQAPGQGLEWMGWINT--NTGNP

10.20

FIG. 24B

HEAVY CHAIN carboxy half

```
        SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTSVTVSS

pos ... 60        70        80  abc       90        100abcdefghijk        110
```

Kabat:

```
HH1 ...NYAQKFQGRVTITXDXSTSTAYMELSSLRSXDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXDXXFDXWGQGTLVTVSS
HH2 ...XYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLXLXSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXFDXWGQGTXVTVSS
HH3 ...YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAXXXXXXXXXXXXXXYYXXFDXWGQGTLVTVSS
```

Germline Consensus (with JH4):

```
hVHI    NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHII   RYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHRXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHIII  YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHIV   NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHV    RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHVI   DYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHVII  TYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
```

18

109

Figure 24C:

109

Kabat numbering of 5H4:

5H4 heavy chain protein sequence:

1-30: EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT
31-35: GYFMH
36-49: WVKQSHGKSLEWIG
50-65: YIS C (52A) YNGDTNY NQNFKG
66-94: KATF TVDTSSSTAY MQF N (82A) S(82B) L(82C) TSED SAVYYCAR
95-102: EGGNYPAY
103-437: WGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV
TLGCLVKGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVPSS TWPSETVTCN
VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLTITLT PKVTCVVVDI
SKDDPEVQFS WFVDDVEVHT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA
AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ
PAENYKNTQP IMDTDGSYFV YSKLNVQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNHH TEKSLSHSPG K

5H4 light chain protein sequence:

1-23: DIVMTQSHKF MSTSVGDRVT ITC
24-34: KASQNVG TAVT
35-49: WYQQKPGQSPKLLIY
50-56: WTSTRHA
57-88: GVPD RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFC
89-97: QQYSSYPLT
98-214: FGAGTKLELKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
STSPIVKSFN RNEC

110

Figure 24D:

Kabat numbering of MC1

MC-1 heavy chain protein sequence:

```
1-30:       EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSGFTFS
31-35:      DYYMY
36-49:      WVRQTPEKRLEWVA
50-65:      YIS X (52A) GGGSTYY PDTVKG
66-94:      RFTI SRDNAKNTLY LQM S (82A) R (82B) L (82C) KSED TAMYYCAR
95-102:     QGSYGYPFAY
103-449:    WG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW
NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG
PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK DVLMISLSPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF
VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS TLRVVSALPI QHQDWMSGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK
PKGSVRAPQV YVLPPPEEEM TKKQVTLTCM VTDFMPEDIY VEWTNNGKTE LNYKNTEPVL
DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KSFSRTPGK
```

MC-1 light chain protein sequence:

```
1-23:       AIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC
24-34:      SASQGIS NYLN
35-49:      WYQQKP DGTVKLLIY
50-56:      YTSSLHS
57-88:      GVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYC
89-97:      QQ YSKLPWT
98-214:     FGGGTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPIVKSFN
RNEC
```

Figure 24E

Kabat numbering of MC3

MC-3 heavy chain protein sequence:

```
1-30:   DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT
31-35:  SDYAW N (35A)
36-49:  WIRQ FPGNKLEWMG
50-65:  YISYSGSTSY NPSLKS
66-94:  RISIT RDTSKNQFFL QL N (82A) S (82B) V (82C) TTEDT ATYYCAR
95-102: LETWLFDY

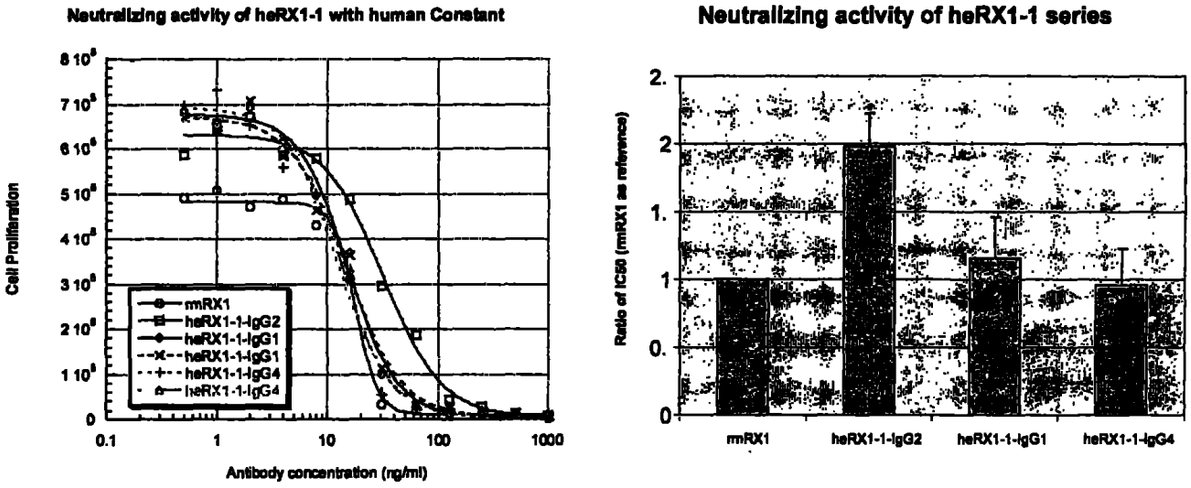
103-522: WGQG TTLTVSSAKT TPPSVYPLAP GCGDTTGSSV TLGCLVKGYF PESVTVTWNS
         GSLSSSVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQTVTCS VAHPASSTTV
         DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP PNIKDVLMIS
         LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWFVNNVEV HTAQTQTHRE DYNSTIRVVS
         TLPIQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKGLVR APQVYILPPP
         AEQLSRKDVS LTCLVVGFNP GDISVEWTSN GHTEENYKDT APVLDSDGSY
         FIYSKLNMKT SKWEKTDSFS CNVRHEGLKN YYLKKTISRS PGLDLDDICA
         EAKDGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF SSVVELKQKI
         SPDYRNMIGQ GA
```

MC-3 light chain protein sequence:

```
1-23:  DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSC
24-34: RASQSIG TSIH
35-49: WYQQRT NGSPRLLIK
50-56: YASESIS
57-88: GIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYC
89-97: QQ SNSWPTT
98-214: FGG GTKLEIKWAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
         DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
         STSPIVKSFN RNEC
```

Fig. 25

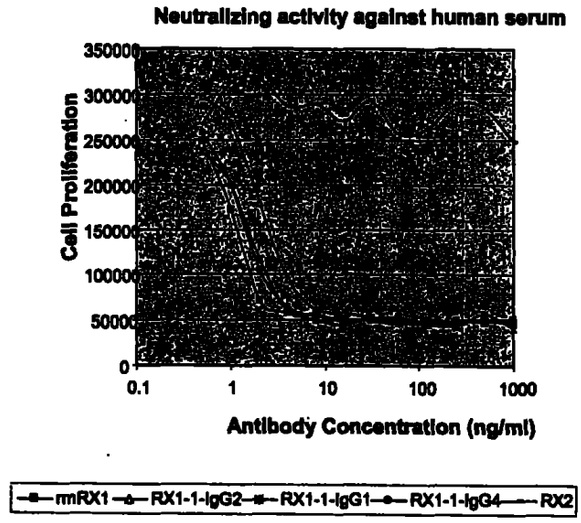
Measurement of Neutralizing Activity of heRX1 With Different IgG Subclass Constant Regions



Against rec mbinant human MCSF

Fig. 26

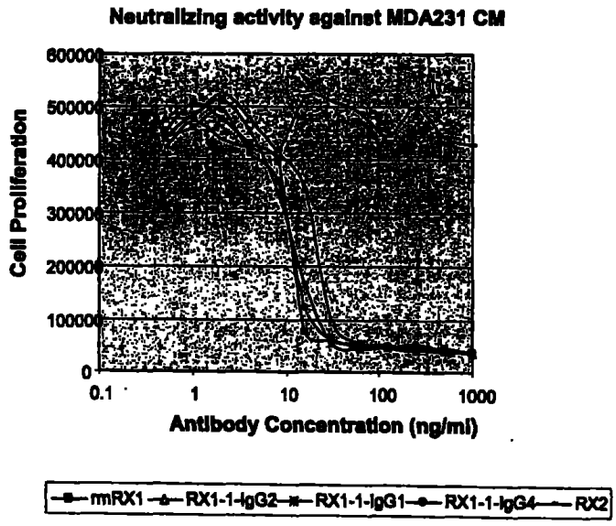
Activity of heRX1-1 With Different IgG Subclasses Against Other Forms of MCSF



Similar results observed against Cyno MCSF in serum and recombinant Cyno MCSF

Fig. 27

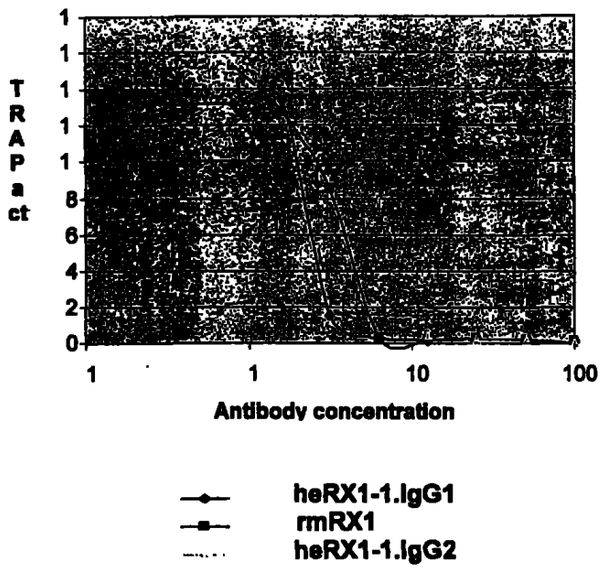
Activity of heRX1-1 With Different IgG Subclasses Against Other Forms of MCSF

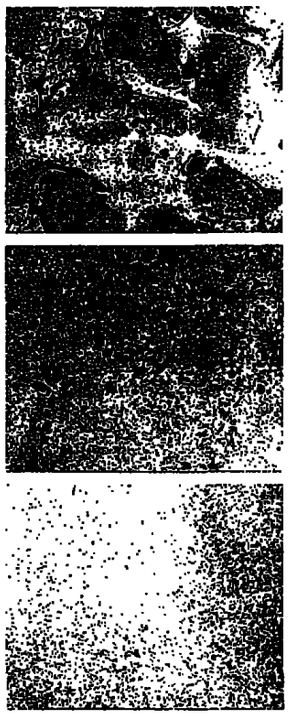


Similar results observed against Cyno MCSF in serum and recombinant Cyno MCSF

Fig. 28

Osteoclastogenesis Assay of heRX1-1 With Different IgG Subclasses





Control
No Ab

heRX1-1.IgG1
= 30 ng/ml

heRX1-1.IgG1
> 30 ng/ml

WO 2005/068503
41/44
PCT/US2005/000546

Amino Acids

MGWSCIILFLVATATGVHS

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSL
QLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK•

Nucleotides

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
[redacted]CTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

117

Amino Acids

MGWSCIILFLVATATGVHS

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSL
QLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK•

Nucleotides

ATGGGTTGGTCTTGCATCATTCTCTTTCTCGTCGCTACCGCAACTGGTGTACACTCCCAAGTTCAACTTCAAGAATCA
GGCCCCGGACTCGTTAAACCCTCTCAAACTCTCTCTCTTACTTGCACTGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTAC
CTTGGAACTGGATCAGACAATTTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGATGGGATATATCTCTTACTCTGGCTCAACCT
CTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAACAATCTCACGCGATACTTCTAAAAATCAATTCTCACTTCAACTTAAC
TCCGTTACTGCCGCCGACACTGCCGTTTACTACTGTGCTTCCTTCGATTACGCCCACGCTATGGATTATTGGGGACA
AGGAACTACCGTCACTGTCAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

118

Fig. 30

HeRX-1 Low Risk Heavy Chain Gamma-4

Amino Acids

MGWSCIILFLVATATGVHSDVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYN
PSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Nucleotides

cDNA

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCA
GTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGA
CGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAC
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

Genomic

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCT
GGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCT
GACCACCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGC
CCCTACCCCAGGCCCTGCGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCT
GCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTG
AGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGG
CCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTG
ACGCATCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCC
AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGG
TCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCGAGG
GCCACATGGACAGAGGTCAGCTCGGCCCACCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGG
GCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA
CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCTGGGTAAATGA

119

SEQUENCE LISTING

<110> LIU et al.

<120> M-CSF-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND USES THEREOF

<130> 21601.003

<140> To be assigned
<141> 2005-01-06

<150> US 60/535,181
<151> 2004-01-07

<150> US 60/576,417
<151> 2004-06-02

<160> 137

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1401
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 1
atgggttggt cctgtatcat cctattcctg gtggccactg ccacaggtgt gcactccgac 60

gtgcagcttc aggagtcagg acctggcctc gtgaaacctt ctcagagtct gtccctcacc 120

tgtactgtca ctgactactc catcaccagt gattacgcct ggaactggat acggcaattc 180

ccagggaata aacttgagtg gatggggtac ataagctaca gtggtagcac ttcctacaat 240

ccatctctca aaagtcggat ctccatcact cgagacacat ccaagaacca gttcttcctg 300

cagctgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcatc cttcgactat 360

gcccacgcca tggattactg gggccaaggg acttcggtca ctgtctcttc cgccaaaaca 420

acagccccat cggtctatcc actggccgct gtgtgtggag atacaactgg ctcctcggtg 480

actctaggat gcctggtcaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 540

ggatcgctgt ccagtggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 600

ctcagcagct cagtgactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 660

gtggcccacc cggcaagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgagcccag agggcccaca 720

atcaagccct gtcctccatg caaatgccca gcacctaacc tcttgggtgg accatccgtc 780

ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 840

tgtgtggtgg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 900

aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc 960

cgggtggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 1020

tgcaaggtca acaacaaaga cctcccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa 1080

gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1140

aaacaggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 1200

tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260

gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320

aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380

ttctcccgga ctccgggtaa a 1401

<210> 2
<211> 447
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

```
Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
            180                 185                 190

Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
                245                 250                 255

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
            260                 265                 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
        275                 280                 285

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
    290                 295                 300

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
305                 310                 315                 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
            340                 345                 350

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
        355                 360                 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
    370                 375                 380

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
                405                 410                 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
            420                 425                 430
```

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
435 440 445

<210> 3
<211> 702
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
atggtatcca cacctcagtt ccttgtattt ttgcttttct ggattccagc ctccagaggt 60

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 120

ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca 180

aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 240

aggtttagtg gcagtggatc agggacagat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 300

gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa attaatagct ggccaaccac gttcggcggg 360

gggacaaagt tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420

tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480

cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540

aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600

ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660

tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 702

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr

121

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 5
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr

85 90 95

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

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 256
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

122

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

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

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
180 185 190

Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
195 200 205

Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
210 215 220

Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
225 230 235 240

Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
245 250 255

<210> 8
<211> 554
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

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

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
260 265 270

123

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
290 295 300

Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305 310 315 320

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
355 360 365

Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
370 375 380

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
545 550

<210> 9
<211> 438
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

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

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
290 295 300

Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305 310 315 320

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
355 360 365

Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
370 375 380

Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
385 390 395 400

Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
405 410 415

Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
420 425 430

Gln Val Glu Leu Pro Val
435

<210> 10
<211> 441
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

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

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

Phe Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
180 185 190

Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
210 215 220

125

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
305 310 315 320

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
340 345 350

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro
355 360 365

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
370 375 380

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
405 410 415

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
    130                 135                 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145                 150                 155                 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
            180                 185                 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
    210
```

<210> 12
<211> 449
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

126

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Arg Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
            180                 185                 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
        195                 200                 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
    210                 215                 220

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
```

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

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
        275                 280                 285

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
                325                 330                 335

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

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
    370                 375                 380

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
                405                 410                 415

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
            420                 425                 430

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

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

127

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 14
<211> 522
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14

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

```
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
            20                  25                  30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
            180                 185                 190

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
        195                 200                 205

Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn
    210                 215                 220

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
225                 230                 235                 240

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val
                245                 250                 255

Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            260                 265                 270
```

128

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

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
305 310 315 320

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

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

Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser
370 375 380

Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
385 390 395 400

Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn
420 425 430

Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser
435 440 445

Arg Ser Pro Gly Leu Asp Leu Asp Asp Ile Cys Ala Glu Ala Lys Asp
450 455 460

Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu
465 470 475 480

Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Ser Val Thr Leu Phe Lys Val
485 490 495

Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Glu Leu Lys Gln Lys Ile Ser Pro
500 505 510

Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
515 520

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Trp Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Tyr Phe Met His
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

Gly

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu Gly Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Glu Thr Trp Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

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

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Thr Ser Thr Arg His Ala
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 38
<211> 9

131

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 39
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(36)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (56)..(57)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)..(84)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (86)..(86)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (101)..(116)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (119)..(119)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (125)..(125)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 39

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Xaa Xaa
20 25 30

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

Ile Gly Xaa Tyr Tyr Arg Ala Xaa Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Asn Pro
50 55 60

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

Phe Ser Leu Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 40
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 40
gacgtacaac ttcaagaatc tggcccaggt ctcgtcaaac cttctcaaac tctctcactc 60

132

acctgcactg ttactgacta ctctattaca tccgactacg cttggaactg gatccgacaa 120

tttcctggta aaaaactcga atggatgggt tatatttctt actctggctc cacctcctac 180

aatccttctc tgaaatcacg catcacaatt tcccgcgata cctctaaaaa tcaattttca 240

ctccaactca attctgttac cgccgccgat actgccacct actactgtgc ctcttttgac 300

tacgctcacg ccatggatta ttggggacag ggtactaccg ttaccgtaag ctca 354

<210> 41
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
caagttcaac ttcaagaatc aggccccgga ctcgttaaac cctctcaaac tctctctctt 60

acttgcactg tatccgatta ctctattact tcagactacg cttggaactg gatcagacaa 120

tttcccggaa aaggactcga atggatggga tatatctctt actctggctc aacctcttac 180

aacccctctc tcaaatctcg aataacaatc tcacgcgata cttctaaaaa tcaattctca 240

cttcaactta actccgttac tgccgccgac actgccgttt actactgtgc ttccttcgat 300

tacgcccacg ctatggatta ttggggacaa ggaactaccg tcactgtcag ctca 354

<210> 43
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 44
gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60

ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120

ggacaggccc cacgacttct tattaaatat gcatcagaac gagccacagg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 45
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 46
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60

ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120

ggacaggccc cacgacttct tattaaatat gcatcagaac gagccacagg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 47
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

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

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 48
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 49
<211> 111
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (98)..(98)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

Pro Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 50
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 51
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Low Risk Light Chain vs. VK6 Subgroup 2-1-(1) A14:

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 52
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 52
gacatagttc tcacacaatc accagcattc ctctcagtta cacccggcga aaaagtaacc 60

tttacctgtc aggcttctca atctatcggc acttctattc actggtatca acaaaaaacc 120

gatcaagctc ctaaactcct cataaaatac gcatccgaat ccatctccgg tatcccctcc 180

agattttcag gctccggctc cggcacagat ttcaccctta ccattagctc agttgaagcc 240

gaagacgcag ctgattacta ctgtcaacaa ataaactcat ggcccactac tttcggcggc 300

ggcactaaac tcgaaataaa acgtacg 327

<210> 53
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 54
<211> 99
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly

<210> 55
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

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

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

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

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

<210> 56
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

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

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

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
100

<210> 57
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

<210> 58
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro
100

<210> 59
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80

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

<210> 60
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

<210> 61
<211> 52
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 61

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser
50

<210> 62
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(33)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val Xaa Xaa
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Ala Ser
50 55

<210> 63
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(37)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (56)..(57)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 63

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Xaa Asp Gly Xaa Xaa Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Ser
50 55

<210> 64
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser
50

<210> 65
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
50 55

<210> 66
<211> 52
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser
50

<210> 67
<211> 58

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

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

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

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser
50 55

<210> 68
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser
50

<210> 69
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
50 55

<210> 70
<211> 52
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
35 40 45

Gln Glu Ala Thr
50

<210> 71
<211> 52
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser
50

<210> 72
<211> 57
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72

Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

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

Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
50 55

<210> 73
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(42)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 73

Xaa Leu Xaa Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Glu Xaa Thr Phe Gly
35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 74
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(40)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 74

Asn Arg Xaa Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Xaa Gln Xaa Pro Arg Xaa Thr Phe Gly
35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 75
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 75

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Xaa Thr Phe Gly
35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 76

<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(44)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 76

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Xaa Thr Phe Gly Gln
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 77
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 78
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 79
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 80
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
20 25 30

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 81
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asp Ala Ala
20 25 30

Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 82
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
20 25 30

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 83
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr
100

<210> 84
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 85
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

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

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

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

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

Cys Ala His Arg
100

<210> 86
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 87
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

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

143

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 88
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 89
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

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

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg
100

<210> 90
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

1014

<210> 91
<211> 58
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 91

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

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

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr
50 55

<210> 92
<211> 59
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(56)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 92

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

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

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

Gly Xaa Ile Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Thr
50 55

<210> 93
<211> 62
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(37)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(52)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature

145

<222> (58)..(59)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 93

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Ser Xaa
20 25 30

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

Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Arg Ala Xaa Xaa Gly Xaa Thr
50 55 60

<210> 94
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)..(33)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(50)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(53)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(56)
<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> misc_feature
<222> (58)..(59)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 94

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr
20 25 30

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

Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Thr
50 55 60

<210> 95
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
50 55

<210> 96
<211> 59
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

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

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

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

146

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys
50 55

<210> 97
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
50 55

<210> 98
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr
50 55

<210> 99
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
50 55

<210> 100
<211> 61
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100

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

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

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

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
50 55 60

<210> 101
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro
50 55

<210> 102
<211> 60
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 102

Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr

147

1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
50 55 60

<210> 103
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(53)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(56)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 103

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

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Xaa Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 104
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(56)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 104

Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

148

Xaa Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 105
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (40)..(52)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(56)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(59)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 105

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 106
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 106

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
1 5 10 15

```
Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
            20                  25                  30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
    50                  55                  60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65                  70
```

<210> 107
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 107

```
Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr
1               5                   10                  15

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp
            20                  25                  30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
    50                  55                  60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65                  70
```

<210> 108
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 108

```
Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
```

1 5 10 15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 109
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 109

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 110
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 110

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

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp
20 25 30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 111
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 111

Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 112
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature

150

<222> (41)..(55)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 112

Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
65 70

<210> 113
<211> 1404
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 113
atgggatgga gttgcattat acttttcctc gttgccaccg ccactggagt tcactctgac 60

gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaacctt ctcaaactct ctcactcacc 120

tgcactgtta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt 180

cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctcctacaat 240

ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcactc 300

caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccacctact actgtgcctc ttttgactac 360

gctcacgcca tggattattg gggacagggt actaccgtta ccgtaagctc agccagcaca 420

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720

gacaaaactc acacatgtcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ccccgggtaa atga 1404

<210> 114
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile
35 40 45

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys
50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

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

151

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

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

Pro Gly Lys
465

<210> 115
<211> 1404
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 115
atgggttggt cttgcatcat tctctttctc gtcgctaccg caactggtgt acactcccaa 60

gttcaacttc aagaatcagg ccccggactc gttaaaccct ctcaaactct ctctcttact 120

tgcactgtat ccgattactc tattacttca gactacgctt ggaactggat cagacaattt 180

cccggaaaag gactcgaatg gatgggatat atctcttact ctggctcaac ctcttacaac 240

ccctctctca aatctcgaat aacaatctca cgcgatactt ctaaaaatca attctcactt 300

caacttaact ccgttactgc cgccgacact gccgtttact actgtgcttc cttcgattac 360

gcccacgcta tggattattg gggacaagga actaccgtca ctgtcagctc agccagcaca 420

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720

gacaaaactc acacatgtcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260

152

gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ccccgggtaa atga 1404

<210> 116
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile
35 40 45

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

153

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

Pro Gly Lys
465

<210> 117
<211> 2002
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 117
atgggatgga gttgcattat acttttcctc gttgccaccg ccactggagt tcactctgac 60

gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaacctt ctcaaactct ctcactcacc 120

tgcactgtta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt 180

cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctcctacaat 240

ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcactc 300

caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccacctact actgtgcctc ttttgactac 360

gctcacgcca tggattattg gggacagggt actaccgtta ccgtaagctc agccagcaca 420

aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttggtga gaggccagca 720

cagggaggga gggtgtctgc tggaagccag gctcagccct cctgcctgga cgcaccccgg 780

ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc atgccccatc tgtctcctca cccggaggcc 840

tctgaccacc ccactcatgc tcagggagag ggtcttctgg atttttccac caggctccgg 900

gcagccacag gctggatgcc cctaccccag gccctgcgca tacaggggca ggtgctgcgc 960

tcagacctgc caagagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaagc ccaccccaaa 1020

ggccaaactc tccactccct cagctcagac accttctctc ctcccagatc tgagtaactc 1080

ccaatcttct ctctgcagag tccaaatatg gtcccccatg cccatcatgc ccaggtaagc 1140

caacccaggc ctcgccctcc agctcaaggc gggacaggtg ccctagagta gcctgcatcc 1200

agggacaggc cccagccggg tgctgacgca tccacctcca tctcttcctc agcacctgag 1260

ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc 1320

tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc 1380

cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1440

gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1500

ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1560

aaaaccatct ccaaagccaa aggtgggacc cacggggtgc gagggccaca tggacagagg 1620

tcagctcggc ccaccctctg ccctgggagt gaccgctgtg ccaacctctg tccctacagg 1680

gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gcccccatcc caggaggaga tgaccaagaa 1740

ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg 1800

ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga 1860

cggctccttc ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa 1920

tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct 1980

ctccctgtct ctgggtaaat ga 2002

<210> 118
<211> 1395
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 118
atgggatgga gttgcattat acttttcctc gttgccaccg ccactggagt tcactctgac 60

gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaacctt ctcaaactct ctcactcacc 120

tgcactgtta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat ccgacaattt 180

cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctcctacaat 240

ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcactc 300

caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccacctact actgtgcctc ttttgactac 360

gctcacgcca tggattattg gggacagggt actaccgtta ccgtaagctc agccagcaca 420

aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720

cccccatgcc catcatgccc agcacctgag ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc 780

cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 840

gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020

tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080

cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140

154

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260

ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1380

tctctgggta aatga 1395

<210> 119
<211> 464
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile
35 40 45

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys
50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
275 280 285

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
340 345 350

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

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

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn
1 5

<210> 121
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Phe Arg Asp Asn Thr Ala Asn
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu
1 5

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 123

Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
1 5

<210> 124
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(17)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (23). (23)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(47)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)..(63)

156

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(67)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)..(78)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (82)..(82)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)..(85)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)..(89)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (91)..(91)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)..(93)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (110)..(110)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (113)..(113)
<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> misc_feature
<222> (115)..(115)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (117)..(118)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 124

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa
65 70 75 80

Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr
100 105 110

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
115

<210> 125
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa= any amino acid

157

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(17)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(44)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)..(66)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)..(73)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)..(76)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (82)..(82)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)..(85)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)..(89)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (91)..(91)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (110)..(110)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (113)..(113)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (115)..(115)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (117)..(118)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 125

Asp Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Pro Xaa Xaa Val Xaa Pro Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Xaa Xaa Lys Leu Glu Trp

158

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Xaa Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Thr Xaa Xaa Asn Xaa Phe Xaa
65 70 75 80

Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr
100 105 110

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
115

<210> 126
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (88)..(89)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)..(93)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (113)..(113)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 126

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

Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Xaa Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (44)..(44)

159

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (88)..(89)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (113)..(113)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 127

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

Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Xaa Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 128
<211> 109

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(12)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(18)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(43)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(57)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(61)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(67)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(70)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (79)..(81)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (103)..(103)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(109)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 128

Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly
50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105

<210> 129
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(18)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)..(57)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(67)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(70)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (79)..(81)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (103)..(103)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(109)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 129

Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Pro Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Xaa Ile Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly
50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105

<210> 130
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(43)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(56)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (109)..(109)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 130

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 131

<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(42)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(54)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(100)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (109)..(109)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 131

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 132
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(43)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (109)..(109)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 132

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr

85 90 95

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

<210> 133
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(17)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(47)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)..(60)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)..(63)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(67)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(69)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (71)..(71)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)..(78)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (82)..(82)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)..(85)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)..(89)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (91)..(91)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)..(93)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (110)..(110)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (113)..(113)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (115)..(115)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (117)..(118)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 133

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu
50 55 60

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa
65 70 75 80

Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr
100 105 110

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
115

<210> 134
<211> 109

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(12)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(18)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(37)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(43)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(45)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)..(57)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (59)..(61)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(65)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(67)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)..(70)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(74)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (76)..(77)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (79)..(81)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (100)..(100)
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (103)..(103)

<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(109)
<223> Xaa= any amino acid

<400> 134

Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly
50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105

<210> 135
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 135
gaaatagtcc ttacccaatc tcccggaacc ctctcagtat ctcccggcga acgagtaacc 60

ttttcatgta gagcatccca atccatcggc acttcaattc actggtatca gcagaaaaca 120

ggtcaatccc cacggcttct tataaaatat gcatcagaat caatttctgg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 136
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136

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

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 137
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 137
gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60

ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120

ggacaggccc cacgacttct tattaaatat gcatcagaat caatttctgg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

168

ANTICUERPO MONOCLONAL M-CSF ESPECÍFICO Y USOS DE ESTOS

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional U.S. No. 60/535,181, presentada en enero 7, 2004, y la solicitud provisional U.S. No. 60/576,417 presentada en junio 2, 2004, cada una de las cuales incorpora como preferencia aquí en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

Esta invención se relaciona con métodos para prevenir y tratar osteólisis, metástasis de cáncer y pérdida de hueso asociada con metástasis de cáncer al administrar un anticuerpo M-CSF específico a un sujeto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La metástasis de cáncer es la causa primaria de la recurrencia post-operación o post-terapia en pacientes con cáncer. A pesar de esfuerzos intensivos para desarrollar tratamiento, la metástasis de cáncer permanece sustancialmente refractaria a la terapia. El hueso es uno de los sitios más comunes de metástasis de varios tipos de cánceres humanos (por ejemplo, cánceres de mama, pulmón, próstata y tiroides). La ocurrencia de metástasis de hueso osteolítica origina seria morbilidad debido al dolor intratable, la alta susceptibilidad a fractura, la

comprensión de los nervios y la hipercalcemia. A pesar de la importancia de estos problemas clínicos, existen pocos tratamientos disponibles para la pérdida de huesos asociada con la metástasis de cáncer.

Los osteoclastos median la reabsorción de hueso. Los osteoclastos son células multinucleadas que se diferencian de las células hemopoieticas. Es generalmente aceptado que los osteoclastos se formen mediante la fusión de precursores nucleares derivados de células madre hematopoyéticas en la medula ósea, en lugar de las divisiones celulares incompletas (Chambers, Bone and Mineral Research, 6: 1-25, 1989; Göthling et al, Clin Orthop Relat R. 120:201-228, 1976; Kahn et al, Nature 258: 325-327. 1975, Suda et al, Endocr Rev 13: 66-80, 1992; Walter, Science 180: 875, 1973; Walter, Science 190: 785-787, 1975; Walter, Science 190: 784-785, 1975). Ellos comparten una célula madre común con células de linaje monolito-macrófago (Ash et al, Nature 283: 669-670, 1980, Kerby et al., J. Bone Miner Res 7: 353-62, 1992). La diferenciación de los precursores en osteoclastos múltinucleares maduros requiere diferentes factores que incluyen estímulo hormonal y local (Athanasou et al., Bone Miner 3: 317-333, 1988; Feldman et al., Endocrinology 107: 1137-1143, 1980; Walter, Science 190: 784-785, 1975; Zheng et al., Histochem J 23: 180-188, 1991)y las células óseas vivientes y las células óseas han mostrado que juegan un papel crítico en el desarrollo de los osteoclastos (Hagenaars

170

et al., Bone Miner 6:179-189, 1989). Las células osteolásticas o estromalos de médula ósea también se requieren para la diferenciación de los osteoclastos. Uno de los factores producidos por estas células que ayudan a al formación de osteoclastos es el factor de estimulación de colonia de macrófago, M-CSF (Wiktor-Jedrzejczak et al., Prodemiento Natl Acad Sci USA 87: 4828-4832, 1990; Yoshida et al., Nature 345: 442-444, 1990). El activador receptor para ligando NF-κ B (RANKI, también conocido como TRANCE, ODF y OPGL) es otra señal (Suda et al., Endocr Rev 13: 66-80, 1992) a través de la cual las células osteolásticas/estromales estimulan la formación de osteoclasto y la reabsorción por vía de un receptor, RANK (TRANCER), localizado sobre osteoclastos y precursores de osteoclasto (Lacey et al., Cell 93: 165-176, 1998; Tsuda et al., Biochem Biophys Res Co 234: 137-142, 1997; Wong et al., J Exp Med 186: 2075-2080, 1997; Wong et al., J Biol. Chem 272: 25190-25194, 1997; Yasuda et al., Endocrinology 139: 1329-1337, 1998; Yasuda et al., Proc Natl Acad Sci US 95: 3597-3602, 1998). Los osteoblastos también secretan una proteína que inhibe fuertemente la formación de osteoclastos denominada osteoprotegerina (OPG, también conocida como OCIO), que actúa como un receptor de señuelo para el RANKL inhibiendo así la señal positiva entre los osteoclastos y osteoblastos por vía del RANK y RANKL.

Los osteoclastos son responsables de disolver tanto la matriz de hueso mineral como orgánica (Blair et al., J Cell

171

Biol 102: 1164-1172, 1986). Los osteoclastos representan células terminalmente diferenciadas que expresan una morfología única polarizada con áreas de membrana especializada y varios marcadores de membrana y citoplasmáticos, tales como fosfataza de ácido resistente a tartrato (TRAP) (Anderson et al. 1979), anhidraza carbónica II (Väänänen et al., Histochemistry 78: 481-485, 1983), receptor de calcitonina (Warshafsky et al., Bone 6: 179-185, 1985) y receptor de vitromectina (Davies et al., J Cell Biol 109: 1817-1826, 1989). Los osteoclastos múltinucleados usualmente contienen menos de 10 núcleos, pero ellos pueden contener hasta 100 núcleos que tienen entre 10 y 100 μm en diámetro (Göthling et al., Clin Orthop Relat R 120: 201-228, 1976). Esto los hace relativamente fáciles de identificar mediante el microscopio de luz. Ellos son altamente vacuolados cuando están en estado activo, y también contienen muchas mitocondrias, indicativas de una alta velocidad metabólica (Mundy, in Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, pages 18-22, 1990). En razón a que los osteoclastos juegan un papel principal en la metástasis de hueso osteolítica, subsiste la necesidad en la técnica de nuevos agentes y métodos para prevenir la estimulación y función de los osteoclastos.

Así, subsiste la necesidad en la técnica de identificar los agentes y métodos para prevenir o tratar la osteólisis o

172

la metástasis de cáncer que incluye la metástasis de hueso osteólica.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Los materiales y métodos de la presente invención cumplen las necesidades anteriormente mencionadas y otras relacionadas en la técnica. En una modalidad de la invención, se suministra un anticuerpo monoclonal no murino, que incluye fragmento funcional, que se une específicamente al mismo epítopo del M-CSF como uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales de murino RX1, MC1, o MC3 que tienen la secuencia de aminoácidos establecidas en las Figuras 4, 14, y 15, respectivamente. En una modalidad relacionada, se suministra un anticuerpo anteriormente mencionado en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste de anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal que incluye un anticuerpo Human Engineered™; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; fragmentos de anticuerpo Fab, F(ab')2; Fv; Sc Fv o SCA; un diacuerpo; anticuerpo lineal; o una muteina de cualquier de estos anticuerpos, que preferiblemente retiene la afinidad de unión de al menos 10^{-7}, 10^{-8}, o 10^{-9} o mayor. Un anticuerpo monoclonal no murino, que incluye el fragmento funcional, que compete con el anticuerpo monoclonal RX1, MC1, y/o MC3 que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en la

173

Figura 4 para la unión al M-CSF por más del 75%, también se contempla.

En otra modalidad, se suministra un anticuerpo monoclonal no murino, que incluye fragmento funcional, en donde dicho anticuerpo monoclonal no murino o fragmento funcional de este se une a un epítopo de M-CSF que incluye el al menos 4, 5, 6, 7 o 8 residuos contiguos de los aminoácidos 98-105 de la Figura 12.

En otra modalidad, la invención suministra un anticuerpo monoclonal no murino que incluye el fragmento funcional, en donde dicho anticuerpo monoclonal no murino o fragmento funcional de este se une a un epítopo de M-CSF que incluye al menos 4, 5, 6, 7 o 8 residuos contiguos de los aminoácidos 65-73 o 138-144 de la Figura 12 (correspondientes a epítopos M-CSF reconocidos por 5H4 o MC3).

Aún en otra modalidad, se suministra el anticuerpo o fragmento anteriormente mencionado que se une al epítopo de M-CSF que incluye los aminoácidos 98-105 de la Figura 12. En una modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado que comprende CDR3 de la Figura 4A. En otra modalidad, se suministra el anticuerpo que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR del anticuerpo de murino RX1 establecido en la Figura 4A. Tal anticuerpo que comprende al menos 1, 2, 3, 4, o 5 CDR de anticuerpo de murino RX1 también

puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, o 5 CDR de cualquiera de los 6 CDR del anticuerpo 5H4 establecido en la Figura 16A-B. Alternativamente, el anticuerpo que comprende al menos 1, 2, 3, 4, o 5 CDR del anticuerpo de murino RX1 también puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, o 5 CDR de cualquier 6 CDR de anticuerpo MC1 establecido en la Figura 16A-B. En aún otra alternativa, el anticuerpo anteriormente mencionado también puede comprende al menos 1, 2, 3, 4, o 5 CDR de cualquier de los 6 CDR del anticuerpo MC3 establecido en la Figura 16A-B. En una modalidad relacionada, el anticuerpo que comprende al menos 1, 2, 3, 4, o 5 CDR de anticuerpo de murino RX1 el que puede comprender al menos 1, 2, 3, 4 o 5 CDR del consenso CDR establecido en la Figura 16A-B. En aún otra modalidad relacionada, en el anticuerpo anteriormente mencionado uno o más residuos del consenso CDR(s) se sustituye por el residuo correspondiente de cualquiera de los CDR del anticuerpo murino RX1, 5H4, MC1, o MC3. La afinidad de unión deseada se puede retener aunque uno o más de los aminoácidos en el anticuerpo hayan sido mutados, por ejemplo mediante sustituciones conservadoras en el CDR, y/o cambios conservadores o no conservadores en los residuos de bajo y moderado riesgo.

En otra modalidad de la invención, se suministran variantes del anticuerpo anteriormente mencionado, que comprende una secuencia aminoácido de cadena pesada variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93,

175

94, 95, 96, 97, 98 o 99% homóloga con la secuencia aminoácido establecida en la Figuras 4A, 13, 14, o 15. En una modalidad relacionada, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de cadena liviana variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% homóloga con la secuencia de aminoácido establecida en las Figuras 4A, 13, 14 o 15.

En aún otra modalidad, el anticuerpo comprende una región constante y una o más regiones de estructura variable de cadena liviana y pesada de una secuencia de anticuerpo humano. En una modalidad relacionada, el anticuerpo comprende una región constante modificada o no modificada de un IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano. En una modalidad preferida, a la región constante es IgG1 o IgG4 humano, la cual puede opcionalmente ser modificada para mejorar o disminuir ciertas propiedades. En el caso de IgG1, las modificaciones a la región constante, particularmente la región de pivote o CH2, puede incrementar o disminuir la función efectuadora, que incluye la actividad ADCC y/o CDC. En otra modalidad, una región constante IgG2 se modifica para disminuir la formación de agregado de antígeno de anticuerpo. En el caso de IgG4, las modificaciones a la región constante, particularmente la región de pivote, pueden reducir la formación de los anticuerpos medios.

176

En aún otra modalidad de la invención, el anticuerpo anteriormente mencionado se deriva de, se basa en, o contiene parte de la secuencia consenso humana, la secuencia de línea germinal humana, la secuencia de línea germinal de consenso humano, o una cualquiera de las secuencias de anticuerpo humano en Kabat, NCBI Ig Blast, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi, Base de Datos Kabat http://www.bioinf,org.uk/abs/seqtest.html, sitio FTP para Kabat Release 5.0 (1992) ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Rel5.0/, Base de Datos ImMunoGeneTics (Montpellier Francia) http://imgt.cnusc.fr:8104/, Base V http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901, Universidad de Zurich http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html, Proyecto de Homología Humana de Anticuerpo Terapéutico (TAHHP) http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html, Análisis de Secuencia y Estructura de Proteína de los Dominios de Anticuerpo http://how.to/AnalyseAntibodies/, Humanización mediante diseño http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/, Recursos de Anticuerpo http://www.antibodyresource.com/educational.html, Ingeniera de Anticuerpo (por TT Wu), Prensa Humana.

En un aspecto preferido de la invención, el anticuerpo anteriormente mencionado es un anticuerpo Human Engineered™. Por Ejemplo, la secuencia de anticuerpo Human Engineered™ es una cualquiera de las secuencias establecidas en las Figuras

177

23-24. Se contemplan otros anticuerpos Human Engineered™ o variantes de estos.

Por ejemplo, en una modalidad, el anticuerpo basado en RX1 anteriormente mencionado se suministra, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido

$X_1VX_2LX_3EX_4GX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}LX_{14}LX_{15}CX_{16}VX_{17}$DYSITSDYAWNWI$X_{18}QX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{24}$WMGUISYSGSTS$X_{25}NX_{26}X_{27}LX_{28}X_{29}X_{30}IX_{31}IX_{32}RX_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}FX_{39}LX_{40}LX_{41}X_{42}VX_{43}X_{44}X_{45}DX_{46}AX_{47}$YYCASFDYAHAMDYWG$X_{48}GTX_{49}VX_{50}VX_{51}X_{52}$ (ID de SEC No.: 124), en donde X es cualquier aminoácido. En una modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido

$DVX_1LX_2EX_3GPX_4X_5VX_6PX_7X_8X_9LX_{10}LX_{11}CX_{12}$VTDYSITSDYAWNWIRQ$X_{13}PX_{14}X_{15}$KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKK$X_{16}RIX_{17}LX_{18}RX_{19}TX_{20}X_{21}NX_{22}FX_{23}LX_{24}LX_{25}X_{26}VX_{27}X_{28}X_{29}DX_{30}$ATYYCASFDYAHAMDYWG$X_{31}GTX_{32}VX_{33}VX_{34}X_{35}$ (ID de SEC No.: 125) en donde X es cualquier aminoácido.

En otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido

X_1VQLQESGPGLVKPSQX_2LSLTCTVX_3DYSITSDYAWNWIRQFPGX_4X_5LEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIX_6IX_7RDTSKNQFX_8LQLNSVTX_9X_{10}DTAX_{11}YYCASFDYAHAMDYWGQGTX_{12}VTVSS (ID de SEC No.: 126), en donde X es cualquier aminoácido. En una modalidad relacionada, se suministra el

198

anticuerpo, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido DVQLQESGPGLVKPSQX$_1$LSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGX$_2$KLEWMGYISYSGSTSY NPSLKSRIX$_3$IX$_4$RDTSKNQFX$_5$LQLNSVTX$_6$X$_7$DTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTX$_8$VTVS S (ID de SEC No.: 127), en donde X es cualquier aminoácido. En aún otra modalidad, se suministra el anticuerpo en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYN PSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS (ID de SEC No.: 41). En aún otra modalidad, se suministra el anticuerpo en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTSYN PSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS (ID de SEC No.: 43).

En otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido X$_1$IX$_2$LX$_3$QX$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$VX$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$VX$_{15}$FX$_{16}$CX$_{17}$AX$_{18}$QSIGTSIHWYX$_{19}$QX$_{20}$X$_2$ $_1$X$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$PX$_{25}$LLIKYASEX$_{26}$X$_{27}$X$_{28}$X$_{29}$IX$_{30}$X$_{31}$X$_{32}$FX$_{33}$GX$_{34}$GX$_{35}$GX$_{36}$X$_{37}$FX$_{38}$LX$_{39}$IX$_4$ $_0$X$_{41}$VX$_{42}$X$_{43}$X$_{44}$DX$_{45}$ADYYCQQINSWPTTFGX$_{46}$GTX$_{47}$LX$_{48}$X$_{49}$X$_{50}$X$_{51}$X$_{52}$ (ID de SEC No.: 128), en donde X es cualquier aminoácido. En una modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo en donde

179

la región variable de cadena liviana comprende la secuencia aminoácido

$X_1IX_2LX_3QX_4PX_5X_6LX_7VX_8PX_9X_{10}X_{11}VX_{12}FX_{13}CX_{14}$ASQSIGTSIHWYQQ$X_{15}TX_{16}X_{17}$SP RLLIKYASE$X_{18}ISX_{19}IPX_{20}RFX_{21}GX_{22}GX_{23}GX_{24}X_{25}FX_{26}LX_{27}IX_{28}X_{29}VX_{30}X_{31}X_{32}DX_{33}$A DYYCQQINSWPTTFG$X_{34}GTX_{35}LX_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (ID de SEC No.: 129), en donde X es cualquier aminoácido. En aún otra modalidad, se suministra el anticuerpo en donde la región variable de cadena liviana comprende la secuencia aminoácido

X_1IX_2LTQSPX_3X_4LSVSPGERVX_5FSCRASQSIGTSIHWYQQ$X_6TX_7X_8X_9$PRLLIKYASEX_{10} $X_{11}X_{12}$GIPX_{13}RFSGSGSGTDFTL$X_{14}IX_{15}X_{16}$VESEDX_{17}ADYYCQQINSWPTTFGX_{18}GTKL EIKRX_{19} (ID de SEC No.: 130), en donde X es cualquier aminoácido.

En otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde la región variable de cadena liviana comprende la secuencia aminoácido

X_1IX_2LTQSPX_3X_4LSVSPGERVX_5FSCRASQSIGTSIHWYQQ$X_6TX_7X_8$SPRLLIKYASEX_9I SGIPX_{10}RFSGSGSGTDFTL$X_{11}IX_{12}X_{13}$VESEDX_{14}ADYYCQQINSWPTTFGX_{15}GTKLEIKR X_{16} (ID de SEC No.: 131), en donde X es cualquier aminoácido. En una modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo en donde la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido

X_1IX_2LTQSPX_3X_4LSVSPGERVX_5FSCRASQSIGTSIHWYQQ$X_6TX_7X_8X_9$PRLLIKYASESI SGIPX_{10}RFSGSGSGTDFTL$X_{11}IX_{12}X_{13}$VESEDX_{14}ADYYCQQINSWPTTFGX_{15}GTKLEIKR X_{16} (ID de SEC No.: 132), en donde X es cualquier aminoácido. En aún otra modalidad, se suministra el anticuerpo en donde

180

la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASESISGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (ID de SEC No.: 45).

En aún otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde la región variable de cadena liviana comprende la secuencia aminoácido EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASERATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (ID de SEC No.: 47). En otra modalidad, se suministra el anticuerpo en donde la región variable de cadena liviana comprende la secuencia de aminoácido EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASERISGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT (ID de SEC No.: 48).

En otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde al menos un X es un aminoácido correspondiente dentro de la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 4A. En una modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo en donde al menos un X es una sustitución conservadora (de acuerdo a la Tabla 1) del aminoácido correspondiente dentro de la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 4A. En aún otra modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo en donde al menos un

X es una sustitución no conservadora (de acuerdo a la Tabla 1) del aminoácido correspondiente dentro de la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 4A. En aún otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo en donde al menos un X es un aminoácido correspondiente dentro de una secuencia de anticuerpo humano.

El anticuerpo Human Engineered™ anteriormente mencionado se deriva de, con base en, o contiene parte de la de la secuencia de consenso de anticuerpo humano, secuencia de línea germinal humana, secuencia de línea germinal de consenso humano, o una cualquiera de las secuencias de anticuerpo humano en Kabat, NCBI Ig Blast, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/muestranGermline.cgi, Base de Datos Kabat http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html, sitio FTP para Kabat Release 5.0 (1992) ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Rel5.0/, Base de Datos ImMunoGeneTics (Montpellier Francia) http://imgt.cnusc.fr:8104/, Base V http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901, Universidad de Zurich http://www.unizh.ch/~anticuerpo/Secuencias/index.html, Proyecto de Homología Humana de Anticuerpo Terapéutico (TAHHP) http://www.pat.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html, Análisis de Secuencia y Estructura de Proteína de los Dominios de Anticuerpo http://how.to/AnalyseAnticuerpos/,

182

Humanización mediante diseño http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/, Recursos de Anticuerpo http://www.anticuerporesource.com/educational.html, Ingeniera de Anticuerpo (por TT Wu), Prensa Humana.

En otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde la secuencia de anticuerpo Human Engineered™ es una de las secuencias establecidas en las Figuras 23-24 o 29-30. En otra modalidad, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica con una de las secuencias de aminoácido de cadena pesada establecidas en la Figura 19B. En aún otra modalidad, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de cadena liviana variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica con una de las secuencias de aminoácido de cadena liviana establecidas en cualquiera de las Figuras 20B-22B.

En aún otra modalidad, el anticuerpo anteriormente mencionado tal como 5H4, MC1 o MC3 con las secuencias establecidas en una de las Figuras 24C-24E es Human Engineered™ de acuerdo con los métodos establecidos en Studnicka et al., Patente U. S. No. 5,766,886 y el Ejemplo 4A presente, utilizando la numeración Kabat establecida en las

183

Figuras 24C-24E para identificar residuos de riesgo bajo, como moderado y alto. En una modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde todos los residuos de bajo riesgo de cualquiera de las cadenas pesada o liviana o ambos son modificados, donde sea necesario, por ser los mismos residuos como una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana. De manera similar, otra modalidad de la invención suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde todos los residuos de riesgo bajo + moderado de cualquiera de las cadenas pesada o liviana o ambas se modifican, donde es necesario, para ser los mismos residuos que la secuencia de inmunoglobulina de referencia humana. Una cadena pesada en donde todos los residuos de riesgo bajo se han modificado se puede combinar con una cadena liviana en donde todos los residuos de riesgo bajo y moderado se han modificado, y viceversa. De manera similar, una cadena liviana o pesada Human Engineered™ anteriormente mencionada se puede combinar con una cadena liviana o pesada de un anticuerpo humanizado o quimérico.

En aún otra modalidad, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada variable con la menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a una de las secuencias de aminoácido de cadena pesada descritas inmediatamente anterior Human Engineered™ de acuerdo con el método Studnicka. En aún otra modalidad, el anticuerpo comprende una secuencia de

184

aminoácido de cadena liviana variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a una de las secuencias de aminoácido de cadena liviana descritas inmediatamente anterior Human Engineered™ de acuerdo con el método Studnicka.

En aún otra modalidad, se suministra un anticuerpo que comprende una cadena pesada como se estableció anteriormente y una cadena liviana como se estableció anteriormente.

En aún otra modalidad de la invención, el anticuerpo anteriormente mencionado tiene una afinidad Kd de al menos 10[-7]. En una modalidad relacionada, el anticuerpo tiene una afinidad Kd de al menos 10[-9].

En otra modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado el cual es un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal que incluye un anticuerpo Human Engineered™; un anticuerpo humanizado; un anticuerpo humano; un anticuerpo quimérico; el fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')2, Fv, ScFv o SCA; un diacuerpo; un anticuerpo linear; o una muteina de cualquiera de estos anticuerpos. En una modalidad relacionada, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo aislado.

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido

185

nucleico que codifica una cadena liviana del anticuerpo anteriormente mencionado. En una modalidad relacionada, el ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico de cadena pesada la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica con la secuencia de nucleótido de cadena pesada establecidas en las Figuras 4A, 13, 14, o 15. En aún otra modalidad relacionada, el ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico de cadena liviana que es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica con la secuencia de nucleótido de cadena liviana establecidas en las Figuras 4A, 13,14, o 15.

En otra modalidad, se suministra un vector que comprende el ácido nucleico aislado anteriormente mencionado. En una modalidad relacionada, se suministra el vector anteriormente mencionado en donde el ácido nucleico aislado está operablemente ligado a una secuencia de control regulador. En aún otra modalidad, se suministra una célula huésped que comprende el vector anteriormente mencionado:

Se contemplan métodos numerosos en la presente invención. Por ejemplo, se suministra un método para producir un anticuerpo anteriormente mencionada que comprende cultivar la célula huésped anteriormente mencionada de tal forma que el ácido nucleico aislado se expresa para producir un anticuerpo. En una modalidad relacionada, el método adicional

comprende la etapa de recuperar el anticuerpo del cultivo de célula huésped. En una modalidad relacionada, se suministra un anticuerpo aislado producido por el método anteriormente mencionado.

Un hibridoma que secreta un anticuerpo anteriormente mencionado también se suministra por medio de la presente invención. Adicionalmente, se suministra un anticuerpo anteriormente mencionado que se conjuga con una toxina.

En otra modalidad de la invención, se suministra una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados y un vehículo farmacéuticamente adecuado, excipiente o diluyente. En una modalidad relacionada, la composición farmacéutica que comprende además un segundo agente terapéutico. En aún otra modalidad relacionada, se suministra la composición farmacéutica en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico para cáncer. En aún otra modalidad relacionada, se suministra la composición farmacéutica en donde el segundo agente terapéutico es un bisfosfonato. En otra modalidad el segundo agente terapéutico es otro anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención se contemplan por tener numerosas características deseables para el tratamiento de enfermedades y desórdenes. En una modalidad de

187

la invención, se suministra una cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados que se unen al M-CSF para evitarle a un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuye a la osteólisis, en donde el anticuerpo reducir efectivamente la severidad de la pérdida de hueso asociada con la enfermedad. De manera similar, uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados que se une al M-CSF se suministra para tratar un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis, en donde dicho anticuerpo reducir efectivamente la severidad de la pérdida de hueso asociada con la enfermedad.

Se contemplan numerosas enfermedades y desórdenes que son susceptibles de tratamiento con base en anticuerpo en la presente invención. En una modalidad de la invención, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado en donde dicho enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociadas con actividad de osteoclasto relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, mal nutrición), enfermedades crónicas (síndromes de mala absorción, falla renal crónica (osteodistrofia renal), enfermedad crónica del hígado (osteodistrofia hepática)), drogas (glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina,

188

alcohol), y enfermedades hereditarias (osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación del hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Pager.

En una modalidad relacionada, se suministra el anticuerpo anteriormente mencionado que se une al M-CSF para evitar o tratar la metástasis de cáncer al hueso, en donde el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, que incluyen cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto biliar o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, y cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer de cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

En otra modalidad de la invención, se suministra un método para seleccionar un anticuerpo M-CSF específico que comprende las etapas de poner en contacto el medio de célula de tumor metastásico, osteoclastos y el anticuerpo candidato;

detecta la formación de osteoclasto, la proliferación y/o diferenciación; e identificar dicho anticuerpo candidato como un anticuerpo M-CSF específico si se detecta una disminución en la formación de osteoclastos, proliferación y/o diferenciación. De manera similar, se suministra el método anteriormente mencionado en donde dicho medio de células de tumos mestastásico incluye células de tumor.

En otra modalidad, se suministra el método anteriormente mencionado en donde la etapa de poner en contacto (a) ocurre in vivo, dicha etapa de detección (b) comprende detectar el tamaño y/o número de metástasis de hueso, y el anticuerpo candidato se identifica como un anticuerpo M-CSF específico si se detecta una disminución en el tamaño y/o número de metástasis de hueso. En una modalidad relacionada, se suministra el método anteriormente mencionado que comprende además la etapa de determinar si el anticuerpo candidato se une a M-CSF. De manera similar, otra modalidad de la invención suministra el método anteriormente mencionado que comprende además la etapa de determinar si dicho anticuerpo candidato inhibe la interacción entre el M-CSF y su receptor M-CSFR.

En otra modalidad de la invención, se suministra un método para identificar un anticuerpo M-CSF específico que pueda prevenir o tratar el cáncer metastásico al hueso, que comprende las etapas de: (a) detectar la unión de un

190

anticuerpo candidato a un epítopo de M-CSF que incluye al menos 4 residuos contiguos de los aminoácidos 98-105 de la Figura 12; y (b) ensayar la capacidad de dicho anticuerpo candidato para prevenir o tratar cáncer que hace metástasis al hueso *in vitro* o *in vivo*.

En otra modalidad de la invención, se suministra un método para identificar un anticuerpo M-CSF específico que pueda prevenir o tratar el cáncer metastásico al hueso, que comprende las etapas de: (a) detectar la unión de un anticuerpo candidato a un epítopo de M-CSF que incluye al menos 4 residuos contiguos de los aminoácidos 65-73 o 138-144 de la Figura 12 (que corresponde a los epítopos M-CSF reconocidos por 5H4 o MC3); y (b) ensayar la capacidad de dicho anticuerpo candidato para prevenir o tratar el cáncer metastásico al hueso *in vitro* o *in vivo*.

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un método de alterar un CDR de un anticuerpo que se una a un epítopo de M-CSF que incluya los aminoácidos 98-105 de la Figura 12 que comprende alterar un aminoácido dentro de un CDR de la secuencia de aminoácido establecidas en la Figura 4A y seleccionar un anticuerpo que se una al M-CSF con una afinidad Ka de al menos 10[-7]. En otra modalidad, se suministra un método de alterar sistemáticamente hasta 60% de la secuencia de aminoácido de cadena pesada establecida en la

191

Figura 4ª que comprende alterar cualquiera de X1-X52 en la secuencia de aminoácido

$X_1VX_2LX_3EX_4GX_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}LX_{14}LX_{15}CX_{16}VX_{17}$DYSITSDYAWNWI$X_{18}QX_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}LX_{24}$WMGYISYSGSTS$X_{25}NX_{26}X_{27}LX_{28}X_{29}X_{30}IX_{31}IX_{32}RX_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}FX_{39}LX_{40}LX_{41}X_{42}VX_{43}X_{44}X_{45}DX_{46}AX_{47}$YYCASFDYAHAMDYWGX$_{48}GTX_{49}VX_{50}VX_{51}X_{52}$ (ID de SEC No.: 133), y ensayar un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácido alterada para unir a un epítopo de M-CSF que incluye los aminoácidos 98-105 de la Figura 12.

En una modalidad relacionada, se suministra un método de alterar sistemáticamente hasta el 60% de la secuencia de aminoácido de cadena liviana establecida en la Figura 4A que comprende alterar cualquiera de las X1-X52 en la secuencia de aminoácido

$X_1IX_2LX_3QX_4X_5X_6X_7X_8X_9VX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}VX_{15}FX_{16}CX_{17}AX_{18}$QSIGTSIHWYX$_{19}QX_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}PX_{25}$LLIKYASEX$_{26}X_{27}X_{28}X_{29}IX_{30}X_{31}X_{32}FX_{33}GX_{34}GX_{35}GX_{36}X_{37}FX_{38}LX_{39}IX_{40}X_{41}VX_{42}X_{43}X_{44}DX_{45}$ADYYCQQINSWPTTFGX$_{46}GTX_{47}LX_{48}X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}$ (ID de SEC No.: 134), y ensayar un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácido alterada para unir a un epítopo del M-CSF que incluye los aminoácidos 98-105 de la Figura 12.

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un método para alterar un CDR de un anticuerpo que se une a un epítopo de M-CSF que incluye los aminoácidos 65-73 o 138-144 de la Figura 12 (que corresponde a los epítopos M-CSF reconocidos por 5H4 o MC3) que comprende alterar un aminoácido dentro del CDR de la secuencia de aminoácido

establecidas en una de las Figuras 13, 14, y 15, y seleccionar un anticuerpo que se una al M-CSF con una afinidad Ka de al menos 10[-7]. En otra modalidad, se suministra un método para alterar sistemáticamente hasta el 60% de la secuencia de aminoácido de cadena pesada establecidas en una de las Figuras 13, 14, y 15, que comprende alterar las secuencias anteriormente mencionadas de acuerdo con los métodos establecidos en Studnicka et al., La Patente U. S. No. 5,766, 886 y el Ejemplo 4A presente, y de acuerdo con la numeración Kabat establecidas en las Figuras 24C-24E, y ensayar un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácido alterada para unirse a un epítopo de M-CSF que incluye los aminoácidos 65-73 o 138-144 de la Figura 12 (que corresponde a los epítopos M-CSF reconocidos por 5H4 o MC3). En una modalidad relacionada, todos los residuos de riesgo bajo se modifican. De manera similar, en otra modalidad de la invención todos los residuos de riesgo bajo o moderado se modifican. En aún otra modalidad, todos los residuos de riesgo bajo o moderado excluyendo prolinas se modifican.

En otra modalidad de la invención, se suministra un método para expresar un anticuerpo que tiene los CDR designados por el proceso anteriormente mencionado. En otra modalidad, se suministra una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se una M-CSF en donde dicho anticuerpo es hecho utilizando el método anteriormente mencionado.

193

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un método para prevenir o reducir la pérdida de hueso que comprende administrar a un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis una cantidad terapéuticamente efectiva de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados, para prevenir o reducir de esta manera la pérdida de hueso asociada con la enfermedad. En una modalidad relacionada, se suministra un método para tratar un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados, reduciendo de esta manera la severidad de la pérdida de hueso asociada con la enfermedad.

En una modalidad relacionada, se suministra el método anteriormente mencionado en donde dicho enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociada con actividad de osteoclastos relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrición), enfermedades crónicas (síndrome de mal absorción, falla renal crónica (osteodistrofia renal), enfermedad crónica del hígado (osteodistrofia hepática)), drogas (glucocorticoides

194

(osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación del hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o Enfermedad de Paget.

En aún otra modalidad, se suministra un método para prevenir o tratar el cáncer metastásico al hueso que comprende administrar a un sujeto afligido con cáncer metastásico una cantidad terapéuticamente efectiva de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados. En una modalidad relacionada, se suministra un método en donde el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia y linfoma ; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, que incluyen cáncer del esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto de la bilis o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, y cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer del cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

195

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un método para prevenir la pérdida de hueso y el crecimiento de tumor que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello cantidades terapéuticamente efectivas de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados. En una modalidad relacionada, el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico. En aún otra modalidad relacionada, se suministra un método en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer o un bisfosfonato. En aún otra modalidad relacionada, se suministra un método en donde el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato. En aún otra modalidad relacionada, se suministra el método anteriormente mencionado en donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico citotóxico. En otra modalidad, se suministra el método anteriormente mencionado en donde el sujeto es imposibilitado para recibir tratamiento con bisfosfonato.

En aún otra modalidad relacionada, se suministra el método anteriormente mencionado en donde el anticuerpo es efectivo para reducir la dosis y el segundo agente terapéutico requerido para lograr un efecto terapéutico. En otra modalidad, el segundo agente terapéutico es un factor de estimulación de colonia no M-CSF, por ejemplo G-CSF, o un anticuerpo anti-RANKL, o un receptor RANKL soluble.

196

En otra modalidad de la invención, se suministra el método anteriormente mencionado en donde el sujeto es un mamífero. En una modalidad relacionada, el mamífero es un humano.

En otra modalidad, se suministra el método anteriormente mencionado en donde el anticuerpo inhibe la interacción entre M-CSF y su receptor (M-CSFR). En otra modalidad relacionada, el anticuerpo inhibe la proliferación de osteoclasto y/o la diferenciación inducida por células de tumor. En aún otra modalidad, se suministra el método anteriormente mencionado en donde el anticuerpo es administra a una dosis entre aproximadamente 2 µg/kg a 30 mg/kg, 0.1 mg/kg a 30 mg/kg o 0.1 mg/kg a 10 mg/kg de peso de cuerpo.

En otra modalidad de la invención, el uso del anticuerpo de la invención se contempla en la elaboración de una medicina para prevenir o reducir la pérdida de hueso en un paciente que exhibe síntomas de osteólisis, y en la elaboración de un medicamento para tratar un paciente afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis. El uso anteriormente mencionado se contempla adicionalmente en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociadas con actividad de osteoclastos relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (que incluye hipercortisolismo,

197

hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (que incluye raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrición), enfermedades crónicas (que incluye síndrome de mal absorción, falla renal crónica (que incluye osteodistrofia renal), enfermedad crónica del hígado (que incluye osteodistrofia hepática)), drogas (que incluye glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (que incluye osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación de hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Paget.

En otra modalidad se contempla el uso de un anticuerpo de la invención en la elaboración de un medicamento para prevenir o tratar el cáncer metastásico al hueso en un paciente que sufre de cáncer metastásico. En una modalidad relacionada, el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia o linfoma; cánceres de cabeza o cuello; cánceres gastrointestinales, que incluye cáncer del esófago, cáncer de estómago, cáncer del colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto de la bilis o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye

carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, o cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer del cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; o cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

En aún otra modalidad, se contempla el uso de un anticuerpo de la invención en la elaboración de un medicamento para tratar un paciente que tiene cáncer.

En cualquiera de los usos anteriormente mencionados, se coordina el medicamento con tratamiento que utilizando un segundo agente terapéutico. En una modalidad relacionada, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer. En modalidades relacionadas, el segundo agente terapéutico es un factor de estimulación de colonia no M-CSF, o un anticuerpo anti-RANKL, o un recepto RANKL soluble, o un bisfosfonato. En una modalidad relacionada, el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato.

En aún otra modalidad de la invención, cualquiera de los usos anteriormente mencionados se contempla en donde el paciente es precluido de recibir tratamiento con bisfosfonato, y/o en donde el paciente ha sido pre-tratado con un segundo agente terapéutico. En una modalidad relacionada, el segundo agente terapéutico es un agente

quimioterapéutico para cáncer, un factor de estimulación de colonia no M-CSF, un anticuerpo anti-RANKL, o un recepto RANKL soluble, o un bisfosfonato. En aún otra modalidad relacionada, el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato. En aún otra modalidad relacionada, el paciente es precluido de recibir tratamiento con bisfosfonato.

En otra modalidad de la invención, el uso de una combinación sinérgica de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento para tratar un paciente que exhibe síntomas de osteólisis en donde luna medicina es coordinada con tratamiento utilizando un segundo agente terapéutico se contempla. En una modalidad relacionada, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico para cáncer, un factor de estimulación de colonia no M-CSF, un anticuerpo anti-RANKL, o un receptor RANKL soluble, o un bisfosfonato. En una modalidad relacionada, el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato. En aún otra modalidad, el paciente es precluido de recibir tratamiento con bisfosfonato.

Se contemplan las modalidades de cualquiera de los usos anteriormente mencionada en donde luna cantidad de anticuerpo en luna medicina está en una dosis efectiva para reducir la dosis del segundo agente terapéutico requerido para lograr un

200

efecto terapéutico. En cualquiera de las modalidades anteriormente mencionadas que se relacionan con la pérdida de hueso asociada con cáncer, luna cantidad de anticuerpo en los medicamentos es preferiblemente efectiva para inhibir la proliferación de osteoclasto y/o la diferenciación inducida por células de tumor.

Una cantidad de anticuerpo en cualquiera de los medicamentos anteriormente mencionados puede ser una dosis entre aproximadamente 2 µg/kg a 30 mg/kg de peso de cuerpo. En una modalidad relacionada, luna cantidad de anticuerpo en los medicamentos esta en una dosis entre aproximadamente 0.1 mg/kg a 30 mg/kg de peso de cuerpo. En aún otra modalidad, luna cantidad de anticuerpo en los medicamentos es una dosis entre aproximadamente 0.1 mg/kg a 10 mg/kg de peso de cuerpo.

Los kits también se contemplan por la presente invención. En una modalidad, se suministra un kit que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención, empacado en un recipiente, tal como un frasco o botella, y que comprende además una etiqueta unida o empacada con el recipiente, la etiqueta describe los contenidos del recipiente y suministra indicaciones y/o instrucciones con relación al uso de los contenidos del recipiente para prevenir o reducir la pérdida de hueso.

En otra modalidad, se suministra un kit comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención, empacado en un recipiente, tal como un frasco o botella, y que comprende además una etiqueta unida o empacada con el recipiente, la etiqueta describe los contenidos del recipiente y suministra indicaciones y/o instrucciones con relación al uso de los contenidos del recipiente para un paciente afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis.

En una modalidad relacionada, se suministra el kit en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociadas con actividad de osteoclastos relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (que incluye hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (que incluye raquitismo/osteomalacia, escorbuto, malnutrición), enfermedades crónicas (que incluye síndrome de mal absorción, falla renal crónica (que incluye osteodistrofia renal), enfermedad crónica del hígado (que incluye osteodistrofia hepática)), drogas (que incluye glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (que incluye osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación del hueso asociada

con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Paget.

En otra modalidad, se suministra un kit que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención, empacado en un recipiente, tal como un frasco o botella, y que comprende además una etiqueta unida o empacada con el recipiente, la etiqueta describe los contenidos del recipiente y suministra indicaciones y/o instrucciones con relación al uso de los contenidos del recipiente para prevenir o tratar cáncer metastásico al hueso. En una modalidad relacionada, el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia o linfoma ; cánceres de cabeza o cuello; cánceres gastrointestinales, que incluye cáncer del esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto de la bilis o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, o cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer del cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; o cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

203

En aún otra modalidad, se suministra un kit que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención, empacado en un recipiente, tal como un frasco o botella, y que comprende además una etiqueta unida o empacada con el recipiente, la etiqueta describe los contenidos del recipiente y suministra indicaciones y/o instrucciones con relación al uso de los contenidos del recipiente para tratar cáncer.

En otra modalidad, el kit comprende además un segundo agente terapéutico. En una modalidad relacionada, el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico para cáncer, un factor de estimulación de colonia nó M-CSF, o un anticuerpo anti-RANKL, o un recepto RANKL soluble, o un bisfosfonato. En una modalidad relacionada, el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato. En aún otra modalidad, el kit incluye instrucciones para tratar un paciente precluido de recibir tratamiento con bisfosfonato.

En otra modalidad, se suministra el kit anteriormente mencionado que comprende una dosis de anticuerpo efectiva para reducir la dosis del segundo agente terapéutico requerido para lograr un efecto terapéutico. En otra modalidad, el kit que comprende una dosis sinérgica de anticuerpo. En aún otra modalidad, el kit que comprende una dosis de anticuerpo efectiva para inhibir la proliferación de

osteoclasto y/o la diferenciación inducida por células de tumor.

En aún otra modalidad de la invención, el kit anteriormente mencionado que comprende una dosis de anticuerpo entre aproximadamente 2 µg/kg a 30 mg/kg de peso de cuerpo. En otra modalidad, el kit que comprende una dosis de anticuerpo entre aproximadamente 0.1 mg/kg a 30 mg/kg de peso de cuerpo. En aún otra modalidad, el kit que comprende una dosis de anticuerpo entre aproximadamente 0.1 mg/kg a 10 mg/kg de peso de cuerpo.

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un empaque, frasco o recipiente que comprende una medicina que comprende uno o más de los anticuerpos anteriormente mencionados e instrucciones que los medicamentos deben utilizar en combinación en cirugía o terapia de radiación. En otra modalidad, se suministra un método para prevenir o tratar cáncer metastásico al hueso comprende las etapas de administrar uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados a un sujeto y tratar el sujeto con cirugía o terapia de radiación. En otra modalidad, se suministra un método de apuntar a una célula tumoral que expresa M-CSF unido a membrana sobre su superficie que comprende la etapa de administrar uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados, en donde el anticuerpo es conjugado a un radionuclido u otra toxina. En aún otra

205

modalidad, se suministra un método para tratar un sujeto que sufre de cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados.

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un método para prevenir la pérdida de hueso que comprende administrar a un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis una cantidad de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados en una cantidad efectiva para neutralizar M-CSF producido por las células del sujeto, la cantidad es mayor que la cantidad efectiva para neutralizar M-CSF producido por las células de cáncer. En una modalidad relacionada, se suministra un método para tratar un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados en una cantidad efectiva para neutralizar M-CSF producido por las células del sujeto, la cantidad siendo mayor que la cantidad efectiva para neutralizar M-CSF producido por las células de cáncer.

En una modalidad de la invención, se suministra una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo RX1, SH4, MC1 y/o MC3, o un RX1, 5H4, MC1 no murino y/o un derivado de anticuerpo MC3 o un anticuerpo que compite con RX1, 5H4, MC1 y/o MC3, y un agente terapéutico para cáncer.

206

En otra modalidad de la invención, se suministra un empaque, frasco o recipiente que comprende una medicina que comprende el anticuerpo RX1, 5H4, MC1 y/o MC3, o un RX1, 5H4, MC1 y/o MC3 no murino derivado del anticuerpo o un anticuerpo de competencia RX1, 5H4, MC1 y/o MC3, e instrucciones que el medicamento debe ser utilizado en combinación con cirugía o terapia de radiación.

En aún otra modalidad de la invención, se suministra un método para tratar un sujeto que sufre de cáncer, en donde las células que comprenden el cáncer no secretan M-CSF, que comprende la etapa de administrar uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama de topología que muestra los enlaces de disulfuro en M-CSF dimérico truncado.

La Figura 2 es un estéreodiagrama de la estructura C-alfa de M-CSF con cada décimo residuo marcado y con el eje de simetría no cristalográfico indicado por una línea punteada.

La Figura 3 es una comparación de actividad inducida por osteoclasto entre M-CSF purificado y medio acondicionado (CM) de células MDA 231 y células MCF 7.

207

La Figura 4A muestra la secuencia de aminoácido de M-CSF del anticuerpo de murino específico RX1 (ID de SEC No.: 2 y 4) (codificado por el inserto cADN del plásmido depositado con el American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, bajo número de depósito ATCC PTA-6113) y la secuencia de ácido nucleico que corresponde (ID de SEC No.: 1 y 3). Las regiones CDR son numeradas y mostradas en negrilla.

Las Figuras 4B y 4C muestran la secuencias de aminoácido de la cadena pesada (ID de SEC No.: 6) y liviana (ID de SEC No.: 5) RX1 de anticuerpo de murino específico M-CSF, respectivamente, con residuos de alto riesgo (negrilla), moderado riesgo (subrayado), identificados de acuerdo a la Studnicka et al., W093/11794.

La Figura 5A muestra que los anticuerpos M-CSF, RX1 y 5A1 son específicos de especies.

La Figura 5B muestra la actividad de neutralización M-CSF de los anticuerpos MC1 y MC3.

La Figura 6 muestra que el anticuerpo RX1 inhibe efectivamente la osteólisis en un modelo de xenoinjerto humano a una concentración de 5 mg/kg.

La Figura 7 muestra que el número de metástasis se reduce cuando el anticuerpo RX1 se administra a cáncer de

708

mama humano MDA-MB-231 que lleva ratones desnudos a una concentración de 5 mg/kg.

Las Figuras 8A y 8B muestra que el anticuerpo M-CSF específico unido a la línea de célula de cáncer de mama MDA-MB-231 o a línea de célula de cáncer de mieloma múltiple ARH77.

La Figura 9 muestra que M-CSF es prevalerte sobre un número de superficies de células de cáncer.

La Figura 10 es la secuencia de aminoácido de M-CSFα (ID de SEC No.: 7).

La Figura 11 es la secuencia de aminoácido de M-CSFβ (ID de SEC No.: 8).

La Figura 12 es la secuencia de aminoácido de M-CSFγ (ID de SEC No.: 9). Un número de polimorfismo en la secuencia de ADN puede dar como resultado las diferencias de aminoácido. Por ejemplo, un polimorfismo común suministra un Ala en lugar de un Pro en la posición 104.

Las Figuras 13, 14, y 15 muestran la secuencias de aminoácido de los anticuerpo de murino específicos M-CSF, 5H4 (ID de SEC No.: 10 y 11), MC1 (ID de SEC No.: 12 y 13) (producido mediante el hibridoma depositado bajo el número de

209

depósito ATCC PTA-6263) y MC3 (ID de SEC No.: 14 y 15) (producido mediante el hibridoma depositado bajo el número de depósito ATCC PTA- 6264), respectivamente.

Las Figuras 16A y B son un alineamiento de Regiones CDR secuencia de aminoácido de cadena pesada y liviana de los anticuerpos de murino específicos de M-CSF de RX1 humano; 5H4; MC1; y MC3 (ID de SEC No.: 16-38).

La Figura 17 muestra como actividades de neutralización de los fragmentos intactos versus los fragmentos Fab para RX1 versus 5H4.

La Figura 18 muestra la estructura de M-CSF con los epítopos RX1, 5H4, y MC3 resaltados (ID de SEC No.: 120,122, y 123).

La Figura 19A muestra (a) la línea de riesgo para la cadena pesada RX1 de murino (H=riesgo alto, M=riesgo moderado, L=riesgo bajo), (b) la secuencia de aminoácido de cadena pesada RX1 (ID de SEC No.: 6), (c) la secuencia de aminoácido de la secuencia de consenso humanos más cercano, Consenso Kabat Vh2, alineada con RX1 (ID de SEC No.: 39) y (d) cambios que son hechos para producir dos secuencias Humanos Engineered™ (ID de SEC No.: 41 y 43). La Figura 19B muestra la secuencias de aminoácido de dos secuencias Humanos Engineered™ de cadena pesada de ejemplo (ID de SEC No.: 41 y

21D

43), designados "riesgo bajo" y "riesgo bajo + moderado" así como también las correspondientes secuencia de ácido nucleicos (ID de SEC No.: 40 y 42).

La Figura 20A muestra (a) la línea de riesgo para la cadena liviana RX1 de murino (H=riesgo alto, M=riesgo moderado, L=riesgo bajo), (b) la secuencia de aminoácido de cadena liviana RX1 (ID de SEC No.: 5), (c) la secuencia de aminoácido de la secuencia de consenso humanos más cercana, consenso Kabat Vk3, alineado con RX1 (ID de SEC No.: 49) y (d) cambios que fueron hechos para produce dos secuencias Humanos Engineered™ de ejemplo (ID de SEC No.: 45 y 47). La Figura 20B muestra la secuencias de aminoácido de la dos secuencias Humanos Engineered™ de cadena liviana de ejemplo (ID de SEC No.: 45 y 47), designados "riesgo bajo" y "riesgo bajo + moderado" así como también las secuencia de ácido nucleicos correspondientes (ID de SEC No.: 44 y 46).

Figura 21A muestra (a) la línea de riesgo para la cadena liviana RX1 de murino (H=riesgo alto, M=riesgo moderado, L=riesgo bajo), (b) la secuencia de aminoácido de cadena liviana RX1 (ID de SEC No.: 5), (c) la secuencia de aminoácido de la secuencia de consenso humanos más cercana, consenso Kabat Vk3, alineado con RX1 (ID de SEC No.: 49) y (d) una secuencia de aminoácido de ejemplo alternativa en la cual las posiciones 54-56 no fueron cambiadas (es decir permaneció la secuencia de murino) (ID de SEC No.: 48). La

211

Figura 21B muestra la secuencias de aminoácido de dos secuencias Humanos EngineeredTM de cadena liviana alternativa de ejemplo (ID de SEC No.: 48, 136), así como también las secuencias de ácido nucleico correspondientes (ID de SEC No.: 137 y 135).

La Figura 22A muestra (a) la línea de riesgo para la cadena liviana RX1 de murino (H=riesgo alto, M=riesgo moderado, L=riesgo bajo), (b) la secuencia de aminoácido de cadena liviana RX1 (ID de SEC No.: 5), (c) la secuencia de aminoácido de la secuencia de línea germinal de consenso humanos más cercana, el subgrupo Vk6 2-1-(1) A14, alineada con RX1 (ID de SEC No.: 50) y (d) cambios que fueron hechos para produce dos secuencias Humanos Engineered™ de ejemplo (ID de SEC No.: 51 y 53). La Figura 22B muestra la secuencias de aminoácido de la dos secuencias Humanos Engineered™ de cadena liviana de ejemplo (ID de SEC No.: 51 y 53), designados "riesgo bajo" y "riesgo bajo + moderado" así como también la correspondiente secuencia de ácido nucleico (ID de SEC No.: 52).

Las Figuras 23A y 23B muestran el alineamiento de la secuencia de aminoácido de cadena liviana RX1 de murino (ID de SEC No.: 54) con varias secuencias de consenso humanos y secuencias de consenso de línea germinal humana utilizando el sistema de numeración Kabat (numeración de aminoácido indicada en la línea designada "POS") (ID de SEC No.: 55-82).

212

Las Figuras 24A y 24B muestran el alineamiento de la secuencia de aminoácido de cadena pesada RX1 de murino (ID de SEC No.: 83) con varias secuencias de consenso humanos y secuencias de consenso de línea germinal humana utilizando el sistema de numeración Kabat (numeración de aminoácido indicada en la línea designados "POS") (ID de SEC No.: 84-112). Las Figuras 24C-24E muestran como los residuos de aminoácidos de los anticuerpos 5H4, MC1 y MC3 corresponden al sistema de numeración Kabat (ID de SEC No.: 10 y 11; ID de SEC No.: 12 y 13; ID de SEC No.: 14 y 15, respectivamente).

La Figura 25 muestra la neutralización comparativa de M-CSF humanos recombinante mediante el anticuerpo RX1 de murino recombinante, marcado como rmRX1, y tres versiones del anticuerpo RX1-1 Humanos Engineered™ (en la cual se han hecho todos los cambios de bajo riesgo) que tiene cada una, una región constante diferente (IgG1, IgG2 o IgG4), marcado como heRX1-1. G1, heRX1- 1. G2, y heRX1-1. G4.

La Figura 26 muestra la neutralización comparativa del suero humanos mediante el anticuerpo RX1 de murino recombinante, marcado como rmRX1 y varias diferentes versiones del heRX1-1 (en la cual se han hecho todos los cambios de bajo riesgo) que tiene cada una, una región constante diferente (IgG1, IgG2 o IgG4), marcado como RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1- IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4.

213

La Figura 27 muestra la neutralización comparativa del medio MDA231 (línea celular de cáncer de mama) mediante el anticuerpo RX1 de murino recombinante, rmRX1, y varias diferentes versiones de heRX1-1 (en la cual se han hecho todos los cambios de bajo riesgo) que tiene cada una, una región constante diferente (IgG1, IgG2 o IgG4), marcado como RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4.

La Figura 28 muestra el efecto sobre la osteoclastogénesis (medida mediante la actividad TRAP) del anticuerpo RX1 de murino recombinante, rmRX1, y dos diferentes versiones heRX1-1 que tiene cada una, una región constante diferente (IgG1 o IgG2), marcada heRX1-1. IgG1 y heRX1-1. IgG2.

La Figura 29A muestra el aminoácido (ID de SEC No.: 114) y la secuencia de nucleótido (ID de SEC No.: 113) para el heRX1-1. IgG1 con los cambios de aminoácido de bajo riesgo. La Figura 29B muestra el aminoácido (ID de SEC No.: 116) y la secuencia de nucleótido (ID de SEC No.: 115) para el heRX1-1. IgG1 con los cambios de aminoácido de riesgo bajo + moderado.

La Figura 30 muestra la secuencia de aminoácido (ID de SEC No.: 119) y la secuencia de nucleótido (cADN (ID de SEC

214

No.: 118) y ADN genómico (ID de SEC No.: 117)) para el heRX1-I. IgG4 cambios de aminoácido de bajo riesgo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La capacidad para hacer metástasis es una característica definida de un cáncer. La metástasis se refiere a la expansión de células cancerígenas a otras partes del cuerpo o a la condición producida por este esparcimiento. La metástasis es un proceso multi etapa complejo que incluye cambios en el material genético de una célula, la proliferación no controlada de la célula alterada para formar un tumor primario, el desarrollo de un nuevo suministro de sangre para un tumor primario, la invasión del sistema circulatorio mediante células provenientes del tumor primario, la dispersión de grupos pequeños de células de tumor primario a otras partes del cuerpo, y el crecimiento de tumores secundarios en aquellos sitios.

El hueso es una de los sitios más comunes de metástasis en los cánceres humanos de mama, pulmón, próstata y tiroides, así como también otros cánceres, y en autopsias tanto como el 60% de los pacientes con cáncer se encontró que tenían metástasis de hueso. La metástasis osteolítica de hueso muestra a una etapa única de resorción de hueso osteoclastóico que no es visto en la metástasis a otros órganos. La pérdida de hueso asociada con la metástasis del

215

cáncer es mediada mediante osteoclastos (células gigantes multinucleadas con la capacidad de reabsorber tejidos mineralizados), que parecen ser activados por productos de tumor.

El factor de estimulación de colonia (CSF-1), también conocido como factor de estimulación de colonia (M-CSF) de macrófago, se ha encontrado crucial para la formación de osteoclasto. Adicionalmente, M-CSF ha mostrado modular las funciones osteoclásticas de los osteoclastos maduros, su migración y su supervivencia en cooperación con otros factores solubles e interacciones célula a célula suministrada por los osteoblastos y fibroblastos (Fixe y Praloran, Cytokine 10: 3-7, 1998; Martin et al., Critical Rev. in Eukaryotic Gene Expresión 8: 107-23 (1998)).

El M-CSF mRNA humano de longitud completa codifica una proteína precursora de los 554 aminoácidos. A través de un empalme alternativo de mRNA y un procesamiento proteolítico post-traduccional diferencial, el M-CSF puede ser secretado en la circulación como una glicoproteína o como un sulfato de condroitina que contiene proteoglicano se expresa como una extendida sobre la membrana de la superficie de las células que producen M-CSF. La estructura tridimensional de los 150 aminoácidos amino terminales bacterialmente expresados M-CSF humano, la secuencia mínima requerida para la actividad biológica completa in vitro, indican que esta proteína es un

216

dímero ligado disulfuro con cada monómero que consiste de cuatro manojos helicoidales alfa y una lámina beta antiparalela (Pandit et al., Science 258: 1358-62 (1992)). Tres distintas especies M-CSF son producido a través de empalme mRNA alternativo. Los tres precursores de polipéptidos son M-CFSα de 256 aminoácidos, M-CSFβ de 554 aminoácidos, y M-CSFγ de 438 aminoácidos. El M-CSFβ es una proteína secretada que no se presenta en forma unida a la membrana. El M-CSFα se expresa como una proteína de membrana integral que es lentamente liberada por el clivaje proteolítico. El M-CSFα es clivado en los aminoácidos 191-197 de la secuencia establecida en la Figura 10. La forma unida a la membrana de M-CSF puede interactuar con receptores o células vecinas y por lo tanto mediar los contactos célula a célula específicos. El término "M-CSF" también puede incluir los aminoácidos 36-438 de la Figura 12.

Varias formas de M-CSF funcionan al unirse a su receptor M-CSFR sobre células objetivo. El M-CSFR es una molécula de membrana de expansión con cinco dominios similares a inmunoglobulina extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio de tiroxina quinaza relacionado con Src interrumpido intracelular. El M-CSFR es codificado por el proto-oncógeno *c-fms*. La unión del M-CSF al dominio extracelular de M-CSFR conduce a la dimerización del receptor, que activa el dominio de quinaza citoplásmica, conduciendo a la autofosforilación y fosforilación de otras

217

proteínas celulares (Hamilton J. A., J Leukoc Biol., 62 (2): 145-55 (1997); Hamilton J, A., Immuno Today., 18 (7): 313-7 (1997).

Las proteínas celulares fosforiladas inducen una cascada de eventos bioquímicos conduciendo a una respuesta celular: mitosis, secreción de citoquinas, fruncidos de membrana, y regulación de la transcripción de su propio receptor (Fixe y Praloran, Cytokine 10: 32-37 (1998)).

El M-CSF es expresado en las células estromales, osteoblastos, y otras células. Este también se expresa en células de tumor de mama, útero, y ovario. La proporción de la expresión de estos tumores se correlaciona con alto grado y pobre pronóstico (Kacinski Ann. Med. 27: 79-85 (1995); Smit et al. , Clin. Cáncer Res. 1: 313-25 (1995)). En los carcinomas de mama, la expresión del M-CSF es prevalente en las células de tumor invasivas opuesta al cáncer intraductal (pre-invasivo) (Scholl et al., J. Natl. Cáncer Inst. 86: 120-6 (1994)). Adicionalmente, el M-CSF se muestra para promover la progresión de los tumores mamarios a malignos (Lin et al., J. Exp. Med. 93: 727-39 (2001)). Para los cánceres de mama y ovario, la producción de M-CSF parece ser responsable del reclutamiento de los macrófagos al tumor.

Como se muestra aquí, un anticuerpo M-CSF específico tal como el anticuerpo RX1, 5H4, MC1 o MC3, neutraliza la

218

inducción de osteoclastos mediante las células de cáncer que ha hecho metástasis y/o reduce la metástasis al hueso en modelos of cáncer animales. Así, la presente invención suministra composiciones y métodos para tratar o prevenir el cáncer, la metástasis del cáncer y la pérdida de hueso asociada con la metástasis del cáncer.

Un RX1 de murino de anticuerpo anti-M-CSF preferido se modificó para ser menos inmunogénico en los humanos con base en el método Humanos Engineering™ de Studnicka et al. En una modalidad preferida, 8 a 12 residuos de aminoácido expuestos en la superficie de la región variable de cadena pesada y 16 a 19 residuos expuestos en la superficie en la región de cadena liviana se modificaron a residuos humanos en las posiciones determinadas como poco probables de afectar adversamente la unión de antígeno o el doblamiento de la proteína, aunque reduciendo su inmunogenicidad con respecto al ambiente humano. Los genes sintéticos que contienen regiones variables de cadena pesada y/o liviana modificadas se construyeron y se ligaron a la cadena pesada γ humana y/o a las regiones constantes de cadena liviana kappa. Cualquier cadena pesada human y las regiones constantes de cadena liviana se pueden utilizar en combinación con las regiones variables del anticuerpo Humanos Engineered™. Los genes de cadena pesada y liviana humanos fueron introducidos en células de mamífero y los productos de inmunoglobulina recombinante resultante se obtuvieron y caracterizaron. Otros

217

anticuerpos anti-M-CSF de ejemplo tales como 5H4, MC1, o MC3 son similarmente Human Engineered™.

El término "anticuerpo derivado de RX1" incluye uno cualquiera de los siguientes:

1) una variante de aminoácido del anticuerpo de murino RX1 que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 4, que incluye variantes que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% homólogo con la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 4, y/o que comprende una secuencia de aminoácido de cadena liviana variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% homólogo con la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 4, teniendo en cuenta los aminoácidos similares para la determinación de la homología;

2) los polipéptidos de unión M-CSF (que excluye RX1 de anticuerpo de murino) comprende uno o más regiones o determinación complementaria (CDR) del RX1 de anticuerpo de murino que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 4, comprende preferiblemente al menos CDR3 de la cadena pesada RX1, y comprende preferiblemente dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o todos los seis CDR;

220

3) los anticuerpos Human Engineered™ que tienen la secuencia de aminoácidos de cadena pesada y liviana establecidas en las Figuras 19B a 22B o variantes de estas que comprenden una cadenas pesada o liviana que tiene al menos 60% de identidad de secuencia de aminoácido con la cadena pesada o liviana Human Engineered™ original de las Figuras 19B a 22B, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente al menos 95%, que incluye por ejemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y 100% idéntica;

4) los polipéptidos de unión M-CSF (que excluye RX1 de anticuerpo de murino) que comprende residuos de alto riesgo de uno o más CDR de los anticuerpos Human Engineered™ de la Figuras 19B a 22B, y comprende preferiblemente los residuos de alto riesgo de dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o todos los seis CDR;

5) los anticuerpo Humanos Engineered™ o variantes que retienen residuos de aminoácidos de alto riesgo establecidos en la Figura 4B, y que comprende uno o más cambios en los residuos de riesgo bajo o moderado establecidos en la Figura 4B;

121

Por ejemplo, que comprende uno o más cambios en el residuo de bajo riesgo y sustituciones conservadoras en un residuo de riesgo moderado establecido en la Figura 4B, o

Por ejemplo, que retienen los residuos de aminoácidos de riesgo moderado y alto establecidos en la Figura 4B y que comprende uno o más cambios en el residuo de bajo riesgo,

donde los cambios incluyen inserciones, supresiones o sustituciones y pueden ser sustituciones conservadoras o pueden originar que el anticuerpo trabajado por ingeniería sea más cercano a una secuencia de cadena liviana o cadena pesada humana, secuencia de cadena liviana de línea germinal humana o secuencia de cadena pesada, una secuencia de cadena liviana de consenso o secuencia de cadena pesada, o una cadena liviana de línea germinal humana de consenso o una secuencia de cadena pesada;

que retenga la capacidad de unir M-CSF. Tales anticuerpos preferiblemente se unen a M-CSF con una afinidad de al menos 10^{-7}, 10^{-8} o 10^{-9} o superior y preferiblemente neutraliza la actividad que induce osteoclastogénesis de M-CSF.

De manera similar, el término "anticuerpo derivado de MC3" que incluye uno cualquiera de los siguientes:

722

1) una variante de aminoácido de anticuerpo de murino MC3 que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 15, que incluye variantes que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% homólogo con la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 15, y/o que comprende una secuencia de aminoácido de cadena liviana variable la cual es al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% homólogo con la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 15, teniendo en cuenta los aminoácidos similares para la determinación de homología;

2) los polipéptidos de unión M-CSF (que incluyen opcionalmente o excluyendo el anticuerpo de murino MC3) que comprende una o más regiones determinantes complementarias (CDR) de anticuerpo de murino MC3 que tiene la secuencia de aminoácido establecida en la Figura 15, que comprende preferiblemente al menos CDR3 de la Cadena pesada MC3, y que comprende preferiblemente dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o todos los seis CDR;

3) los anticuerpos Human Engineered™ generados al alterar la secuencia de murino de acuerdo con los métodos establecidas en Studnicka et al., Patente U. S. No. 5,766, 886 y el ejemplo 4A presente, utilizando la numeración Kabat

223

establecidas en las Figuras 24C-24E para identificar residuos de riesgo bajo, moderado y alto; tales anticuerpos comprenden al menos una de las siguientes cadena pesadas y al menos una de la siguientes cadena livianas: (a) una cadena pesada en la cual todos los residuos de bajo riesgo se han modificado, si es necesario, son los mismos residuos como una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana o (b) a cadena pesada en la cual todos los residuos de riesgo bajo o moderado se han modificado, si es necesario, son los mismos residuos como una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana, (c) una cadena liviana en la cual todos los residuos de bajo riesgo se han modificado, si es necesario, son los mismos residuos como una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana o (b) una cadena liviana en la cual todos los residuos de riesgo bajo o moderado se han modificado, si es necesario, son los mismos residuos como una secuencia de inmunoglobulina de referencia humana

4) los variantes de los anticuerpos anteriormente mencionados en el parágrafo precedente (3) que comprende la cadenas pesada o liviana que tiene al menos 60% de identidad de secuencia de aminoácido con la cadena pesada o liviana Human Engineered™ original, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente al menos 95%, que incluye por ejemplo, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,

224

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y 100% idéntica;

5) los polipéptidos de unión M-CSF (que incluyen opcionalmente o excluyen el anticuerpo de murino MC3) que comprende los residuos de alto riesgo de uno o más CDR del anticuerpo MC3 de murino de la Figura 15, y que comprende preferiblemente los residuos de alto riesgo de dos o más, o tres o más, o cuatro o más, o cinco o más, o todos los seis CDR;

6) los anticuerpo Humanos Engineered™ o variantes que retienen los residuos de aminoácidos de alto riesgo del anticuerpo MC3 de murino, y comprende uno o más cambios en los residuos de riesgo bajo o moderado;

por ejemplo, que comprende uno o más cambios en el residuo de bajo riesgo y sustituciones conservadoras en el residuo de riesgo moderado, o

por ejemplo, que retienen los residuos de aminoácidos de riesgo moderado y alto y comprende uno o más cambios en el residuo de bajo riesgo,

donde los cambios incluyen inserciones, supresiones o sustituciones y pueden ser sustituciones conservadoras o pueden originar anticuerpos trabajados por ingeniería para

225

ser más cercano en secuencia a la secuencia de cadena liviana humana o cadena pesada, una secuencia de cadena liviana de línea germinal humana o secuencia de cadena pesada, una secuencia de cadena liviana humana de consenso o cadena pesada, o una secuencia de cadena liviana de línea germinal humana de consenso o una secuencia de cadena pesada;

que retenga la capacidad de unir M-CSF. Tales anticuerpos preferiblemente se unen al M-CSF con una afinidad de al menos 10^{-7}, 10^{-8} o 10^{-9} o mayor y preferiblemente neutraliza la actividad inducida por los osteoclastogénesis del M-CSF.

El término "anticuerpo derivado 5H4" o "anticuerpo derivado MC1" es similarmente definido de acuerdo con la descripción anterior.

Como se describió en detalle aquí, los anticuerpos derivados de RX1, 5H4, MC1 o MC3, que incluye los anticuerpos o variantes Human Engineered™, pueden ser de isotipos diferentes, tales como IgG, IgA, IgM o IgE. Los anticuerpos de la IgG pueden incluir una región constante diferente, por ejemplo un anticuerpo IgG2 pueden ser modificado para desplegar una región constante IgG1 o IgG4. En modalidades preferidas, la invención suministra anticuerpo o variantes Humanos Engineered™ que comprende una región constante IgG1 o IgG4 modificada o no modificada. En el caso de las

126

modificaciones IgG1, a la región constante, particularmente la región de pivote o CH2, puede incrementar o disminuir la función efectuada, incluyendo la actividad ADCC y/o CDC. En otras modalidades, una región constante IgG2 se modifica para disminuir la formación de agregado o antígeno de anticuerpo. En el caso de Modificaciones IgG4 a la región constante, particularmente la región pivote, puede reducir la formación de la mitad de anticuerpos. En modalidades específicas de ejemplo, se suministra mutar la secuencia pivote IgG4 Cis-Pro-Ser-Cis a la secuencia pivote IgG1 Cis-Pro-Pro-Cis.

Los anticuerpos Human Engineered™ que contiene las regiones constantes IgG1 o IgG4 se muestran aquí por tener propiedades mejoradas comparadas con los anticuerpos Human Engineered™ que contiene las regiones constantes IgG2. La escogencia de la región IgG1 o IgG4 Fc mejora la afinidad de unión, la actividad de neutralización de M-CSF, y la actividad de anti-osteoclasto. Adicionalmente, la escogencia de la región IgG1 o IgG4 Fc suministra complejos antígeno-anticuerpo que se semejan más cercanamente a aquellos formados por el anticuerpo de murino padre.

La movilidad de la región pivote parece así afectar marcadamente la unión del anticuerpo al antígeno dimérico M-CSF así como también la actividad de neutralización del anticuerpo. La invención contempla de manera general que la preparación de anticuerpos que contienen la cadena pesada que

227

comprenden una región constante IgG1 o IgG4 modificada o no modificada, particularmente los dominios pivote y CH2, o preferiblemente al menos los dominios pivote, mejoran la afinidad de unión y/o hacen más lenta la disociación del anticuerpo proveniente de antígeno diméricos.

El término "anticuerpo que compite con RX1" incluye

1) un anticuerpo monoclonal no murino o no roedor que se une al mismo epítopo de M-CSF como RX1 de murino que tiene unas secuencias de cadena liviana y pesada completas establecidas en la Figura 4;

2) un anticuerpo monoclonal no murino o no roedor que se una al menos a 4 aminoácidos contiguos de los aminoácidos 98-105 del M-CSF de la Figura 12; y

3) un anticuerpo monoclonal no murino o no roedor que compite con el anticuerpo murino RX1 que tiene la secuencia completa establecida en la Figura 4 para unirse al M-CSF, por más del 75%, más del 80%, o más del 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%. Tales anticuerpos preferiblemente se unen a M-CSF con una afinidad de al menos 10^{-7}, 10^{-8} o 10^{-9} o superior y preferiblemente neutraliza la actividad que induce osteoclastogénesis de M-CSF.

El término "Anticuerpo que compite MC1" o "anticuerpo que compite con MC3" o "anticuerpo que compite con 5H4" es similarmente definido con referencia a los anticuerpos de murino 5H4, MC1 o MC3 que tienen la secuencia de cadena liviana y pesada completas establecida en las Figuras 13, 14 o 15, respectivamente, y con referencia al epítopo de M-CSF unido al anticuerpo, por ejemplo aminoácidos 65-73 o 138-144 de la Figura 12 (que corresponde a los epítopos M-CSF reconocidos por el 5H4 o MC3).

Opcionalmente, cualquiera anticuerpo M-CSF quimérico, humano o humanizado públicamente descrito antes de la fecha de presentación de esta, o descrito en una solicitud presentada antes te fecha de presentación de esta, está excluida del alcance de la invención.

Anticuerpo monoclonal "no roedor" es cualquier anticuerpo, tal como se define ampliamente aquí, que no es un anticuerpo monoclonal de roedor intacto completo generado por un hibridoma de roedor. Así, los anticuerpos de no roedor incluyen específicamente, pero no están limitados a, variantes de anticuerpo de roedor, fragmentos de anticuerpo de roedor, anticuerpos lineales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos Human Engineered™ y anticuerpos humanos, que incluyen anticuerpos humanos producidos de animales transgénicos o por vía tecnología de despliegue. De manera similar, los anticuerpos no murino

229

incluyen pero no están limitados a variantes de anticuerpos de murino, fragmentos de anticuerpo de murino, anticuerpos lineales, quiméricos, humanizados, Humanos Engineered™ y anticuerpos humanos..

"Tumor", como se utiliza aquí, se refiere a todos los crecimientos y proliferaciones de células neoplásicas, sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos cancerosos y pre-cancerosos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica del mamífero que es típicamente caracterizada por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen pero no están limitados a, carcinoma; linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer del hígado, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

230

"Tratamiento" es una intervención desarrollada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un desorden. De acuerdo con esto, "tratamiento" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como profiláctico a medidas de prevención. Aquellos necesitados del tratamiento incluyen aquellos ya con el desorden así como también como aquellos en los cuales el desorden va a ser prevenido. En el tratamiento de tumor (por ejemplo, cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de células de tumor, o hacer las células de tumor más susceptibles al tratamiento mediante otros agentes terapéuticos, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia. El tratamiento de pacientes que sufren de síntomas clínicos, bioquímicos, radiológicos o subjetivos de la enfermedad, tal como osteólisis, pueden incluir aliviar algunos o todos los síntomas o reducir la predisposición a la enfermedad. La "patología" del cáncer incluye todos fenómenos que comprometen el bienestar de los pacientes Esto incluye, sin limitación, los crecimientos celular anormal o no controlable, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de la células vecinas, liberación de citoquinas u otros productos secretorios en niveles anormales, supresión o agravamiento de respuesta inflamatoria o inmunológica, etc. Así, la mejora después del tratamiento pueden ser manifestada en como un tamaño de tumor disminuido, decline en la velocidad de crecimiento de tumor, la destrucción de las

células de tumor existentes o las células metástasicas, y/o una reducción del tamaño o número de metástasis.

"Mamífero" para los propósitos del tratamiento se refiere a cualquiera animal clasificado como mamífero, que incluye humanos, animales domésticos y de granja, y de zoológico, deportivos, o animales domésticos, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

Como se utiliza aquí, la frase "cáncer metastásico" se definido como cánceres que tiene potencial de esparcirse a otros áreas del cuerpo, particularmente hueso. Una variedad de cánceres puede hacer metástasis al hueso, pero los cánceres que han hecho metástasis más comunes son de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides y próstata. Por vía de ejemplo, otros cánceres que tienen el potencial de hacer metástasis al hueso incluyen pero no están limitados a adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, que incluye cáncer del esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto de la bilis o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, y cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer del

232

cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, que incluye melanoma maligno y cáncer de célula escamosa. La presente invención contempla especialmente la prevención y tratamiento de lesiones osteolíticas inducidas por tumor en el hueso.

Como se utiliza aquí, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere y pretende referir se a una cantidad de anticuerpo M-CSF terapéutica o profiláctica que sería apropiada para una modalidad de la presente invención, que sacará el efecto terapéutico o profiláctico o la respuesta cuando administra de acuerdo con el régimen de tratamiento deseado.

"M-CSF" humano como se utiliza aquí se refiere a un polipéptido humano que tiene substancialmente la misma secuencia de aminoácido que los polipéptidos M-CSFα, M-CSFβ, o M-CSFγ humano maduro descritos en Kawasaki et al., Science 230: 291 (1985), Cerretti et al., Molecular Immunology, 25: 761 (1988), o Ladner et al. , EMBO Journal 6: 2693 (1987), los cuales se encontraron aquí como referencia. Tal terminología refleja el entendimiento de los tres M-CSF maduros que tienen diferentes secuencias de aminoácido, como se describió anteriormente, y que la forma activa del M-CSF es un dímero unido a disulfuro; así, cuando el término "M-CSF" se refiere a la forma biológicamente activa, se entiende la forma dimérica. "Dimero M-CSF" se refiere a dos monómeros

233

de polipéptidos M-CSF que han sido dimerizados y que incluyen ambos homodímeros (que consisten de dos del mismo tipo de monómeros M-CSF) y heterodímeros (que consisten de dos diferentes monómeros). Los monómeros M-CSF se pueden convertir a los dímeros M-CSF in vitro como se describió en la Patente U. S. No. 4,929, 700, la cual se incorpora aquí como referencia.

LOS ANTICUERPOS ANTI-M-CSF

La presente invención suministra un anticuerpo M-CSF específico , tales como RX1, 5H4, MC1, y/o MC3, las formulaciones farmacéuticas incluyen un anticuerpo M-CSF específico , tales como RX1, 5H4, MC1, y/o los métodos MC3, de preparar las formulaciones farmacéuticas, y métodos para tratar pacientes con las formulaciones farmacéuticas y los compuestos. El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpo multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpo que se pueden unir a antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)2, Fv, anticuerpos de cadena simple, diacuerpos), y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores en tanto que ellos exhiban la actividad biológica deseada.

234

El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpo sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en menor cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra el sitio antigénico. Adicionalmente, como contraste a las preparaciones de anticuerpo convencional (policlonal) que son típicas incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante simple sobre el antígeno. Adicionalmente, a su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque ellos son sintetizados mediante cultivo homólogo, no contaminados por otras inmunoglobulinas con diferentes especificidades y características.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo por ser obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no va a ser construido como requiriente de producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonal han sido utilizados de acuerdo con la presente invención pueden ser hechos mediante el método hibridoma primero descrito por Kohler et al., Nature, 256: 495 [19751, o puede ser elaborado

255

mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente U.S. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las librerías de anticuerpo de fago utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352: 624628 [1991] y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Dependiendo de la secuencia de aminoácido del dominio constante o de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales, la IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de estas pueden ser además divididas en subclases o isotipos, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a diferentes clases de inmunoglobulina son llamados alfa, delta, epsilon, gama y mu respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulina son bien conocidas. Los diferentes isotipos tiene diferentes funciones efectuadoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad ADCC.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa intacto, preferiblemente la unión de antígeno con la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmento de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')2, y fragmentos Fv; los diacuerpos; los anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng., 8 (10):

236

1057-1062 (1995)); las moléculas de anticuerpo de cadena simple; y los anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. La digestión de papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión de antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión de antígeno simple, y un fragmento "Fv" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento de pepsina produce un fragmento F(ab')2 que tiene dos fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena simple" o "sFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido simple. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominios VH y VL que posibilitan al Fv formar la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión del sFv ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer- Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El término región "hipervariable" se refiere a residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables por la unión de antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácido de una región de determinación complementaria o CDR [es decir los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena liviana y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describió por Kabat et al.,

237

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] y/o aquellos residuos de un aro hipervariable (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena liviana y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) el dominio variable de cadena pesada como se describió por [Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196 : 901-917 (1987)].

"Estructura" o residuos FR son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión de antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena liviana (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH VL). Al utilizar un ligador que es demasiado cortos para permitir el pareo entre dos dominios sobre la misma cadena. Los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión de antígenos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y 30 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

238

En algunas modalidades, puede ser deseable generar anticuerpos monoclonales multiespecíficos (por ejemplo biespecíficos) que incluyen anticuerpos monoclonales, humanos, humanizados, Human Engineered™ o anti-M-CSF variantes que tiene especificidades de unión para al menos dos diferentes epítopos. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos diferentes epítopos de M-CFS. Alternativamente, un brazo anti-M-CSF se puede combinar con un brazo que se une a una molécula de disparo sobre un leucocito tal como una molécula receptora de célula T (por ejemplo, CD2 o CD3), o los receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de enfocar el mecanismo de defensa celular a la célula que expresa el M-CSF. Los anticuerpos biespecíficos también pueden ser utilizados para localizar agentes citotóxicos a células que expresan M-CSF. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión M-CSF y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo saporin, anti-interferón-60, alcaloide vinca, cadena ricin A, metotrexato o el isótopo radioactivo hapteno). Los anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab').sub.2).

De acuerdo con otra aproximación para elaborar anticuerpos biespecíficos, la interfase entre el par de moléculas de anticuerpo se puede trabajar por ingeniería para

239

pata maximizar los porcentajes de heterodímeros que son recuperados del cultivo de célula recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfase de la primer molécula de anticuerpo son reemplazadas con cadena laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofano). Con la "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la o las cadenas laterales largas son creadas sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar cadenas laterales de aminoácido largas con unas pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto suministra un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como los homodímeros. Ver W096/27011 publicado Septiembre 6,1996.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden ser hechos utilizando cualquiera de los métodos de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y son descritos en la Patente U.S. No. 4,676,980, junto con un número de técnicas reticulación.

240

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo han sido descritas en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando enlace químico. Brennan et al., Science 229: 81 (1985) describe en un procedimiento en donde los anticuerpos intactos son proteolíticamente clivados para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos son reducidos en la presencia del agente complejante ditiol arsenito de sodio para estabilizar ditioles vicinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados son convertidos a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB es luego reconvertido al Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado Fab'-TNB apara formar el anticuerpo específico. Los anticuerpos específicos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas. En aun una modalidad adicional, los fragmentos Fab'-SH directamente recuperados de E. coli pueden ser químicamente acoplados in vitro para formar anticuerpos biespecíficos. (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)).

Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo $F(ab')_2$ biespecífica completamente humanizada. Cada fragmento Fab' fue separadamente secretado de E. coli y sometido a acoplamiento químico directo in vitro para formar el

241

anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, así como también dispara la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra los objetivos tumorales de mama humana.

Varias técnicas para elaborar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente desde cultivo de célula recombinante también han sido descritos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos han sido reproducidos utilizando cremalleras de leucina. (Kostelny et al., J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992)). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun fueron ligados a las porciones Fab' en dos diferentes anticuerpos mediante fusión de gen. Los homodímeros de anticuerpo fueron reducidos en la región pivote para formar monómeros y luego reoxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) ha suministrado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico.

Los fragmentos comprenden una región variable de cadena pesada (V_H) conectada a una región variable de cadena liviana (VL) mediante un ligador que es demasiado corto para permitir parearse entre los dos dominios sobre la misma cadena. De

247

acuerdo con esto, los dominios V_Hy V_L de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión de antígeno. Otra estrategia para elaborar los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena simple (sFv) también han sido reportados. Ver Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Alternativamente, el anticuerpo biespecífico puede ser un "anticuerpo lineal" producido como se describe en Zapata et al. Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de fragmentos Fd tandem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión de antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Los anticuerpos con más de dos valencias también se contemplan. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)).

En ciertas modalidades, el anticuerpo monoclonal, humano, humanizado, Human Engineered™ o anti-M-CSF variante es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo RX1, 5H4, MC1, o MC3. Varias técnicas han sido desarrolladas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron derivados por vía de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por

243
243

ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos directamente mediante células huésped recombinantes. Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) describe la secreción de los fragmentos de anticuerpo funcionales de bacterias (ver, por ejemplo, Better et al., Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988)). Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de E. coli y acoplar químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). En otra modalidad, el $F(ab')_2$ se forma utilizando una cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula $F(ab')_2$. De acuerdo con otra aproximación los fragmentos Fv, Fab o $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el practicante experto.

Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con el diagnóstico o usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros proteináceos o solutos no proteináceos. En las modalidades preferidas, el anticuerpo será purificado (1) a mayor de un 95% en peso del anticuerpo

244

determinado por el método Lowry, y más preferiblemente más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácido N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa de giro o (3) homogeneizar mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul Coomassie preferiblemente teñido de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes en razón de que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, el anticuerpo aislado estará preparado por al menos una etapa de purificación.

Para una descripción detallada de la estructura y la generación de anticuerpos, ver Roth, D. B., y Craig, N. L., *Cell*, 94: 411-414 (1998), y Patente Estadounidense No. 6,255,458, incorporada aquí como referencia en su totalidad. En resumen el proceso para generar ADN que codifica los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y liviana ocurre primariamente en el desarrollo de células B. Antes del re-arreglo y la unión de varios segmentos de gel de inmunoglobulina, los segmentos de gen V, D, J y (C) constante son encontrados generalmente en proximidad relativamente cercana sobre un cromosoma simple. Durante la diferenciación de la célula B, uno de cada uno de los miembros de la familia apropiados de los segmentos de gen V, D, J (o solamente V y J en el caso de los genes de cadena liviana) son recombinados

245

para formar funcionalmente genes de inmunoglobulina pesada y liviana funcionalmente redispuestos. Este proceso de redisposición de segmento de gen parece ser secuencial. Primero, las uniones D a J de cadena pesada son hechas, seguidas por lasa uniones de V a DJ de cadena pesada y las uniones V a J de cadena liviana.

La recombinación de los segmentos de gen de la región variable para formar regiones variables de cadena pesada y liviana es mediada mediante secuencias de señal de recombinación (RSS) que plantean recombinacionalmente los segmentos V, D y J competentes. Los RSS necesarios y suficientes para dirigir la recombinación comprenden un heptámero simétrico de dyad, un nonámero rico en AT y una región espaciadora interviniente de 12 0 23 pares bases. Esta señales son conservadas entre los diferentes locus y especies que llevan a cabo la recombinación de D-J (o V-J) y son funcionalmente intercambiables. Ver Oettinger, et al. (1990), Science, 248,1517-1523 y las referencias citada allí. El heptámero comprende la secuencia CACAGTG o su análogo seguido por un espaciador de secuencia no conservada y luego un nonámero que tiene la secuencia ACAAAAACC o su análogo. Estas secuencias son encontradas en el J, o el lado corriente abajo, de cada segmento de gen V y D. Inmediatamente precedentes los segmentos D y J de línea germinal son de nuevo dos secuencias de señal de recombinación, primero el nonámero y luego el heptámero de nuevo separado por una

246

secuencia no conservada. Las secuencias heptomérica y nonamérica seguido por los segmentos V_L, V_H o D son complementarias a aquellas que preceden los segmentos J_L, D o J_H con las cuales ellas se combinan. Los espaciadores entre las secuencias heptaméricas y nonaméricas tienen 12 pares base de largo o entre 22 y 24 pares base de largo

Además de la redisposición de los segmentos V, D y J, se genera diversidad adicional en el repertorio primario de la cadena pesada y liviana de inmunoglobulina por vía de la recombinación variable de los sitios donde los segmentos D y J en la cadena liviana están unidos y en donde los segmentos D y J de la cadena pesada están unidos. Tal variación en la cadena liviana ocurre típicamente dentro del último codón del segmento de gen V y el primer codón del segmento J. La imprecisión similar en la unión ocurre sobre el cromosoma de cadena pesada entre los segmentos V y J_H y se pueden extender obre tanto como 10 nucleótidos. Adicionalmente, varios nucleótidos se pueden insertar entre los segmentos D y J_H y entre V_H y D que no son codificados por ADN genómico. La adición de estos nucleótidos es conocida como diversidad de región N.

El efecto neto de tales redisposiciones en los segmentos de gen de región variable y la recombinación variable que puede ocurrir durante cada unión es la producción de un repertorio de anticuerpo primario.

247

El "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento y un sitio de unión de antígeno completo. Esta región consiste de un dominio variable de cadena pesada y uno de liviana en asociación no covalente estrecha. Es en esta configuración que los CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión de antígeno o de la superficie del dímero VH VI. Colectivamente, los seis CDR le confieren especificidad de unión de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aun un dominio variable simple, (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicos) para un antígeno) tienen la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a un afinidad inferior que en sitio de unión completa.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena liviana y del primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región pivote de anticuerpo. El Fab'-SH es la designación aquí para el Fab' en la cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tilo libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')2 originalmente fueron reproducidos en pares de fragmentos Fab' que tiene cisteínas pivote entre ellas.

248

Por "anticuerpo neutralizante" se significa una molécula de anticuerpo que es capaz de eliminar o reducir significativamente una función efectuadora de un antígeno objetivo a la cual se une. De acuerdo con esto, un anticuerpo anti-objetivo "neutralizante" es capaz de eliminar o reducir significativamente una función efectuadora tal como una actividad de enzima una unión de ligando, o una señalización intracelular.

Como se suministró aquí, las composiciones y los métodos para tratar cáncer metastásico y/o pérdida de hueso asociada con metástasis de cáncer pueden utilizar uno o más anticuerpos utilizados singularmente o en combinación con otra terapia para lograr los efectos deseados. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden aislar de un animal que produce el anticuerpo como resultado de contacto directo con un antígeno ambiental o la inmunización con el antígeno. Alternativamente, los anticuerpos se pueden producir mediante metodología de ADN recombinante utilizando uno de los sistemas de expresión de anticuerpo bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Anticuerpos: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Tales anticuerpos pueden incluir proteínas de fusión quimérica IgGs recombinantes que tiene secuencias derivadas de inmunoglobulina o anticuerpos "Human Engineered™" que pueden ser utilizados para tratamiento de metástasis de cáncer y/o pérdida de hueso asociada con la

metástasis de cáncer de acuerdo con la presente invención. Además de moléculas de longitud completa intactas, el término "anticuerpo" también se refiere a fragmentos de estas (tales como por ejemplo, fragmentos scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' y F(ab)2) o multímeros o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos que se unen al M-CSF (M-CSFR). Estos fragmentos de anticuerpo se unen a antígeno y pueden ser derivados para exhibir características estructurales que faciliten la claridad y la toma, por ejemplo, mediante la incorporación de residuos de galactosa.

En una modalidad de la presente invención, los anticuerpos monoclonales M-CSF se pueden preparar esencialmente como se describió en Halenbeck et al. Patente U.S. Pat. 5,491,065 (1997), incorporada aquí como referencia. Los anticuerpos monoclonales M-CSF de ejemplo incluyen aquellos que se unen a un epítopo conformacional evidente asociado con M-CFS recombinante o dimérico nativo con neutralización concomitante de actividad biológica. Estos anticuerpos son substancialmente no reactivos con formad biológicamente inactivas de M-CSF que incluye M-CSF monoméricos y químicamente derivados.

En otras modalidades de la presente invención, se suministran anticuerpos monoclonales anti-M-CSF Human Engineered™. La frase "anticuerpo Human Engineered™" se refiere a un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano,

típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón. Alternativamente, un anticuerpo Human Engineered™ se puede derivar de un anticuerpo quimérico que retiene o retiene substancialmente las propiedades de unión de antígeno del anticuerpo parental, no humano pero que exhibe inmunogenicidad disminuida comparado con el anticuerpo parental cuando se administra a humanos. La frase "anticuerpo quimérico" como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia que contiene anticuerpo derivada de dos diferentes anticuerpos (ver, por ejemplo, Patente U.S. No. 4,816,567) que se origina típicamente de diferentes de especies. La mayoría de anticuerpos quiméricos típicamente comprenden fragmentos de anticuerpo humano y de murino, generalmente regiones constante de humano y variable de ratón.

La frase "región de determinante de complementariedad" o el término "CDR" se refiere a secuencias de aminoácido las cuales definen juntas la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural del sitio de unión de inmunoglobulina nativa (ver, por ejemplo, Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 917 (1987); Kabat et al., U. S. Dept. of Health y Human Services Publicación NIH No. 91 3242 (1991)). La frase "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectuadoras. En la presente invención, las regiones constante de ratón son preferiblemente sustituidas por regiones constante de humano. Las regiones constante de los anticuerpos sujetos son

derivadas de inmunoglobulinas humanas. La región constante de cadena pesada se puede seleccionar de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, epsilon, gama o mú.

Los anticuerpos de la presente invención se dice que son inmunoespecíficos o que se unen específicamente si ellos se unen al antígeno con un K_a mayor que o igual a aproximadamente 10^6M^- preferiblemente mayor o igual a aproximadamente 10^7M^{-1}, más preferiblemente mayor que o igual a aproximadamente 10^8M^{-1}, y más preferiblemente mayor o igual a aproximadamente 10^9M^{-1}, $10^{10}M^{-1}$, $10^{11}M^{-1}$ o $10^{12}M^{-1}$. El anticuerpo anti-M-CSF pueden unirse a diferentes formas de ocurrencia natural de M-CSF, que incluyen aquellas expresadas por los tejidos de huésped/de sujeto así como también aquellos expresados por el tumor. Los anticuerpos monoclonales descritas aquí, tales como el anticuerpo RX1, 5H4, MC1, o MC3, tiene afinidad para M-CSF y están caracterizados por la constante de equilibrio de disociación (Kd) de al menos $10^{-4}M$, preferiblemente al menos aproximadamente $10^{-7}M$ a aproximadamente $10^{-8}M$, más preferiblemente al menos aproximadamente $10^{-8}M$, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$ o $10^{-12}M$. Tales afinidades pueden ser fácilmente determinadas utilizando técnicas convencionales, tales como mediante diálisis de equilibrio; al utilizar el instrumento BIAcore 2000, utilizando procedimientos generales subrayados por el fabricante; mediante radioinmunoensayo M-CSF marcado con ^{125}I; o mediante otro método conocido por los expertos. Los datos

252

de afinidad pueden ser analizados por ejemplo, mediante el método Scatchard et al., Ann N. Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949). Así, será evidente que los anticuerpos M-CSF preferidos exhibirán un alto grado de especificidad para el M-CSF y se unirán con afinidad substancialmente más baja a otras moléculas. Los anticuerpos preferidos se unen M-CSF con una afinidad similar que el RX1 de murino de la figura 4 se une al M-CSF, exhibe baja inmunogenicidad, e inhibe la metástasis de las células de cáncer cuando se ensayan en modelos de animal con enfermedad metastásica. Otros anticuerpos de ejemplo se unen a M-CSF con afinidad similar a como el 5H4, MC1, MC3 de las figuras 13, 14 o 15, respectivamente, se unen al M-CSF.

El antígeno ha sido utilizado para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, M-CSF intacto o un fragmento del M-CSF que retiene el epítopo deseado, opcionalmente fusionado con otro polipéptido que le permite al epítopo ser desplegado en su conformación nativa. Alternativamente, las células que expresan M-CSF en su superficie celular se pueden utilizar para generar anticuerpos. Tales células se pueden transformar para expresar M-CSF o pueden ser otras células de ocurrencia natural que expresan M-CSF. Otras formas de M-CSF útiles para generar anticuerpos serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

253

Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos policlonales son preferiblemente elevados en los animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Una respuesta de anticuerpo mejorada se puede obtener al conjugar el antígeno relevante a la proteína que es inmunogénica en las especies a ser inmunizadas, por ejemplo, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, sero albúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de frijol de soya utilizando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuo cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica.

Los animales son inmunizados contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos, o los derivados al combinar, por ejemplo 100 µg 0 5 µg de proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con tres volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectar la solución intradérmicamente en sitios múltiples. Un mes más tarde, los animales son reforzados con un quinto {de la fracción (1/10)} de la cantidad original del péptido o conjugado en un adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en sitios múltiples. A los 7-14 días post inyección de refuerzo, los

254

animales son sangrados y el suero es ensayado para título de anticuerpo. Los animales son reforzados hasta que el título se estabiliza.

Preferiblemente, el animal es reforzado con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden hacer en un cultivo de células recombinante como fusiones de proteína. También, los agentes de agregación tales como la alúmina son adecuadamente utilizados para mejorar la respuesta inmune.

Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se puede hacer utilizando el método de hibridoma primero descrito en Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinante.

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o un mono macaco, se inmuniza como se describe aquí para elicitar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden utilizar in vitro. Los linfocitos son entonces fusionados con células de mieloma que utilizan un agente de fusión adecuado, tal como

polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59- 103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas así son sembradas y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de células de mieloma parenterales no fusionadas. Por ejemplo, si a las células de mieloma parenteral les falta la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuya sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, sostienen una producción de alto nivel estable de anticuerpo mediante las células de producción de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles al medio. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Las líneas de mieloma de murino de ejemplo incluyen aquellas derivadas de tumores de ratón MOP-21 y M.D.-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution

256

Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA.

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma se crecen se ensaya para producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante células de hibridoma sse determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado enzima (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, ser determinada mediante análisis Scatchard (Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)).

Después de que son identificadas las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad deseada, la afinidad, y/o actividad, los clones se pueden subclonar al limitar los procedimientos de dilución y hacerlos crecer mediante métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medios D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como tumores de ascitos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por subclones son adecuadamente separados del

257

medio de cultivo, fluido de ascitos o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, Sefarosa de proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Producción Recombinante de Anticuerpos

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar de las células de hibridoma utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo al utilizar sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales). La determinación de la secuencia requerirá generalmente el aislamiento en al menos una porción del gen del cADN de interés. Usualmente esto requiere clonar el ADN o, preferiblemente, el mARN (es decir cADN) que codifica los anticuerpos monoclonales. La clonación se lleva a cabo utilizando técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, que se incorpora aquí como referencia). Por ejemplo, una librería de cADN se puede construir mediante transcripción inversa del poliA+ mARN, preferiblemente mARN asociado a membrana, y la librería seleccionada utilizando sondas específicas para secuencias de gen de polipéptido de inmunoglobulina humana. En una modalidad preferida, sin embargo, la reacción de

258

cadena de polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar cADNs (o una porción de longitud completa de cADN) que codifica un segmento de gen de inmunoglobulina de interés (por ejemplo, un segmento de variable de cadena liviana). Las secuencias amplificadas pueden ser fácilmente clonadas en cualquier vector adecuado, por ejemplo, vectores de expresión, vectores minigen, o vectores de despliegue de fago. Se apreciará que el método particular de clonación utilizado no crítico, en tanto sea posible determinar la secuencia de alguna porción del polipéptido de inmunoglobulina de interés. Como se utiliza aquí, una molécula de ácido nucleico "aislada" o secuencia de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que es (1) identificada y separada de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual es ordinariamente asociada en la fuente natural del ácido nucleico o (2) clonada, amplificada, etiquetada o distinguida de otra forma de los ácidos nucleicos anteriores de tal forma que la secuencia del ácido nucleico de interés se puede determinar, se considera aislada. Una molécula de ácido nucleico es aislada es diferente en la forma o configuración en la cual esta se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas por lo tanto se distinguen de la molécula de ácido nucleico en la medida en que esta sale en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que ordinariamente expresan en anticuerpo donde, por ejemplo, en la molécula de ácido

259

nucleico está en un sitio cromosomal diferente de aquel de las células naturales.

Una fuente de ARN utilizada para clonar y secuenciar es un hibridoma producido al obtener una célula B del ratón transgénico y fusionarla la célula B a una célula inmortal. Una ventaja de utilizar hibridomas es que ellos pueden ser fácilmente seleccionados, y un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano de interés seleccionado. Alternativamente, el ARN se puede aislar de las células B (o del bazo completo) del animal inmunizado. Cuando las fuentes diferentes a hibridoma son utilizadas, puede ser deseable seleccionar las secuencias que codifican las inmunoglobulinas o los polipéptidos de inmunoglobulina con características de unión específicas. Un método para tal selección es el uso de la tecnología de despliegue de fago. El despliegue de fago se describe en por ejemplo, Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, y Caton y Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6450-6454 (1990), cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia. En una modalidad que utiliza tecnología de despliegue de fago, en cADN de un ratón transgénico inmunizado (por ejemplo cADN de bazo total) se aísla, la reacción de cadena de polimerasa se utiliza para amplificar una secuencias de cADN que codifican una porción de polipéptido de inmunoglobulina, por ejemplo, las regiones CDR, y las secuencias amplificadas se insertan en un vector de fago. Los cADN que codifican péptidos de interés, por

260

ejemplo, péptidos de región variable con características de unión deseadas, se identifican mediante técnicas estándar tales como la toma panorámica.

La secuencia del ácido nucleico amplificado o clonado es luego determinada. Típicamente la secuencia que codifica la región variable completa del polipéptido de inmunoglobulina se determina, sin embargo, algunas veces se adecuará a la secuencia solamente una porción de una región variable, por ejemplo, la porción que codifica el CDR. Típicamente la porción secuenciada tendrá al menos 30 bases de longitud, más a menudo codificación basada para al menos aproximadamente un tercio o al menos la mitad de la región variable será secuenciada.

La secuenciación será llevada cabo sobre clones aislados de una librería de cADN, o, cuando se utiliza PCR, después de subclonar la secuencia amplificada o al dirigir la secuenciación o al dirigir la secuenciación PCR del segmento amplificado. La secuenciación es llevada a cambio utilizando técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, y Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, que se incorpora aquí como referencia). Al comparar la secuencia del ácido nucleico clonado con las secuencias publicadas de los genes de inmunoglobulina humanos y los cADN, un experto en la técnica

261

será capaz posiblemente de determinar, dependiendo de la región secuenciada, (i) el uso del segmento de línea germinal del polipéptido de inmunoglobulina de hibridoma (que incluye el isotipo de la cadena pesada) (ii) la secuencia de las regiones variables de cadena pasada y liviana, que incluyen las secuencias que resultan de la adición de la región N y en el proceso de mutación somática. Una fuente de información de secuencia de gen de inmunoglobulina es el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

Una vez aislado, el ADN se puede ubicar en vectores de expresión, que son luego transferidos en las células huésped tal como células de *E. coli*, células COS de simio, células 293 de riñón embriónico humano (por ejemplo células 293E), células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de los anticuerpos es bien conocida en la técnica.

Las secuencias de control de expresión se refieren a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son útiles para los procariota por ejemplo, incluyen un promotor,

262

opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión de ribosoma. Las células eucarióticas son conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación, y mejoradores.

El ácido nucleico es operablemente ligado cuando este se ubica en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para un líder de presecuencia o secretorio está operablemente ligado al ADN para un polipéptido si este se expresa como una proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador está operablemente ligado a una secuencia codificante si este afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está operablemente ligado a una secuencia codificante si este está ubicado con el fin de facilitar la traducción. De manera general, operablemente ligado significa que las secuencias de ADN que está ligadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, contiguas en la fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra mediante la ligación en sitios de restricción convenientes. En tales sitios no existen, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos son utilizados de acuerdo con la práctica convencional.

La célula, línea celular, y cultivo celular son a menudo utilizados intercambiablemente y todos las tales designaciones incluyen progenie. Las células transformantes y

263

transformadas incluyen las células sujeto primarias y los cultivos derivados de estos sin importar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica tal como se selecciona para la célula originalmente transformada. Donde se pretenden diferentes designaciones, está será clara del contexto.

En una modalidad alternativa, la secuencia de aminoácido de una inmunoglobulina de interés se puede determinar mediante secuenciación de proteína. Las secuencias de nucleótido codificantes adecuadas se pueden designar de acuerdo a una tabla de codón universal.

Las variantes de secuencia de aminoácido del anticuerpo deseado se pueden preparar al introducir cambios de nucleótido apropiados en el ADN codificante, o mediante síntesis de péptido. Tales variantes incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos den de los anticuerpos. Cualquier combinación de supresión, inserción, y sustitución se hace apara llegar a la construcción final siempre y cuando la construcción final posea las características deseadas. Los cambios del aminoácido también pueden alterar los procesos post-traduccionales del

anticuerpo monoclonal, humano, humanizado, Human Engineered™ o variante, tal como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de las secuencias de aminoácido del anticuerpo se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácido de ocurrencia natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

La invención también suministra ácido nucleico aislado que codifica anticuerpos de la invención, opcionalmente operablemente ligado para controlar las secuencias reconocidas por una célula huésped. Los vectores y las células huésped que comprenden los ácidos nucleicos y las técnicas recombinates para la producción de los anticuerpos, que pueden comprender cultivar la célula huésped de tal forma que el ácido nucleico se expresa, y opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo de célula huésped o el medio de cultivo.

765

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica es aislado e insertado en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo al utilizar sondeas del oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores selectivos, un elemento mejorador, un promotor, una secuencia de terminación y transcripción.

(1) Componente de secuencia de señal

El anticuerpo de esta invención se puede producir recombinantemente no solamente de manera directa, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de clivaje específico en el terminal N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señal seleccionada preferiblemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir clivada por una peptidasa de señal) por la célula huésped. S las células huéspedes procarióticas no reconocen y procesan la secuencia

266

de señal de anticuerpo nativa, la secuencia de señal se puede sustituir por una secuencia de señal seleccionada, por ejemplo, del grupo de pectato liasa (por ejemplo, pelB) fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, o líderes de enterotoxina II estables al calor. Para la secreción de levadura la secuencia de la señal nativa se puede sustituir por, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, un factor líder (que incluyen los líderes del factor alfa de Sacaromices y Kluiveromices), o el líder de ácido de fosfatasa, el líder de glucomilasa de C albicans; o la señal descrita en la WO90/13646. En la expresión de célula de mamífero, las secuencias de señales de mamífero así como también los líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex están disponibles.

El ADN para tal región precursora está ligado en estructura de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(2) Origen del componente de replicación

Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que le posibilitan al vector replicarse en una o más células huéspedes seleccionadas. De manera general, en los vectores de clonación esta secuencia es aquélla que le posibilita al vector replicarse independientemente del ADN cromosomal huésped, e incluye los orígenes de replicación o las secuencias autónomamente replicantes. Tales secuencias son

267

bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gran negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y varios orígenes virales son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el SV40 pueden típicamente ser utilizados solamente porque este contiene el promotor temprano).

(3) Componente de marcador selectivo

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen selectivo, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típica codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, tetraciclina, G418, geneticina, histidinol, o ácido micofenólico (b) deficiencias auxotróficas de complemento, o (c) nutrientes críticos de suministro no disponibles de medios de complejo, por ejemplo el gen que codifica la D-alanina racemasa para Bacilli.

Un ejemplo de un esquema de selección que utiliza una droga para disminuir el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son exitosamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína de confiere resistencia

a la droga y así sobrevive el régimen de selección. Ejemplos de tal selección dominante utilizan las drogas metotrexato, neomicina, histidinol, puromicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que posibilitan la identificación de células competentes para tomar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneina-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneina de primate, adenosina deaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR son primero identificadas al cultivar todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando el DHFR tipo silvestre es empleado en la línea de célula de ovario de hámster Chino (CHO) deficiente en actividad DHFR.

Alternativamente, las células huésped, (particularmente los huéspedes tipo silvestre que contiene DHFR endógeno) transformados y cotransformados con secuencias de ADN que codifican anticuerpos de la invención, proteína DHFR tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como amino aminoglicosido 3'-fosfotransferasa (APH) se puede seleccionar

269

mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente se selección para el marcador seleccionable tal como antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Ver Patente U.S. No. 4,965,199.

Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen terapéutica 1 en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979)). El gen trp1 suministra un marcador de selección para una cepa mutante de levadura a la que le falta la capacidad de crecer en triptofano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión trp1 en el genoma de célula huésped de levadura suministra entonces un ambiente efectivo para detectar la transformación mediante el crecimiento de la ausencia de triptofano. De manera similar las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20,622 o 38,626) se contemplan mediante plásmidos conocidos que llevan el gen Leu2. Las cepas de levadura deficientes en *Ura3* son complementadas por plásmidos que llevan el gen *ura3*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1.6 µm pKD1 pueden ser utilizados para la transformación de levaduras Kluiveromices. Alternativamente, un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de becerro recombinante se reporta para K. lactis. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). Los vectores de expresión multicopia estables para la secreción de sero albúmina humana

270

recombinante madura mediante cepas industriales de Kluiveromices también han sido identificadas. Fleer et al, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

(4) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y eso está operablemente ligado al ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor de arabinosa (por ejemplo, araB), promotor phoA, los sistemas promotores β-lactamasa y lactosa, alcalino fosfatasa, un sistema promotor de triptofano (trp), y promotores híbridos tales como el promotor de tac. Sin embargo, otros promotores bacteriales son adecuados. Los promotores para uso en sistemas bacteriales también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S. D.) operablemente ligada a un ADN que codifica el anticuerpo de la invención.

Las secuencias promotoras son conocidas por los eucariotas. Habitualmente todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases corriente arriba del sitio de donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontró 70 a 80 bases corriente arriba del inicio de la transcripción de muchos genes en una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier

271

nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos en una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de una cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias son adecuadamente insertadas en vectores de expresión eucarióticos.

Ejemplos de secuencias de promotor adecuadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas como la enolasa, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, hexoquinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfata isomerasa, 3-fosfoglicerata mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada mediante las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenada 2, isocitocromo C, ácido fosfatasa, enzimas degradativas asociadas con metabolismo de nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables para utilización de maltosa y galactosa. Los vectores adecuados y los promotores para uso en expresión de levaduras son adicionalmente descritos en la EP 73,657.

272

Los mejoradores de levadura también son ventajosamente utilizados con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo proveniente de los vectores en célula de huésped de mamífero es controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus Abelson leucemia, el virus polioma, el virus de la viruela, adenovirus (tales como Adenovirus 2), el virus del papiloma de bovino, el virus del sarcoma aviar, más preferiblemente citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus de Simio 40 (SV40), provenientes de promotores de mamífero heterólogo, por ejemplo el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, de los promotores de choque térmico, siempre y cuando estos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 son convenientemente obtenidos como un fragmento de restricción SV40 que también contiene el origen viral SV40 de replicación. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano es convenientemente obtenido como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresión de ADN huéspedes mamíferos que utilizan el virus del papiloma bovino se describen la patente U.S. No. 4,419, 46. Una modificación del sistema se describe en la Patente U.S. No. 4,601,978. Ver también Reyes et al., *Nature* 297: 598-601 (1982). Sobre la expresión de cADN de β-interferon humnano en

273

células de ratón bajo el control de promotor de timidina quinasa proveniente del virus herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus de sarcoma rous se puede utilizar como el promotor.

(5) Componente del elemento mejorador

La transcripción del ADN que codifica el anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores se incrementa a menudo al insertar una secuencia mejoradota en el vector. Muchas secuencias mejoradoras son ahora conocidas de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, uno utilizará el mejorador proveniente de un virus de célula eucariótica. Ejemplos incluyen el mejorador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el mejorador del promotor temprano de citomegalovirus, el mejorador de polioma sobre el lado tardío del origen de replicación, y los mejoradores de adenovirus. Ver también Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos de mejoramiento para la activación de promotor eucarióticos. El mejorador puede ser unido en el vector en una posición 5′ o 3′ a la secuencia codificadora del anticuerpo, pero es preferiblemente localizado en el sitio 5′ del promotor.

(6) Componente de terminación de transcripción

274

Los vectores de expresión usados en células huéspedes eucarióticas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el mARN. Tales secuencias son disponibles comúnmente de las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3' de ADN o cADN viral o eucariótico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mARN que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. *Ver* WO94/11026 y el vector de expresión descrito allí. Otro es el terminador de transcripción de cadena liviana de la inmunoglobulina de ratón.

(7) Selección y transformación de las células huéspedes

Células huéspedes adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores aquí son las células procariotes, de levadura o eucariotas mayores descritas anteriormente. Las procariotes adecuadas para este propósito incluyen la eubacteria, tal como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella tiphymurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y

275

Shigella, lo mismo que *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p.e., *B. licheniformis* 41 P descrito en DD 266,710 publicado en Abril 12, 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huesped de clonación de *E. coli* preferido es el *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de ser limitativos.

En adición a las procariotes, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levadura son adecuados para clonar o para la expresión de huéspedes para vectores que codifican anticuerpos. El *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de horneado común es la más comúnmente usada entre los microorganismos huéspedes eucarióticos inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies, y cepas son disponibles comúnmente, y útiles aquí, tal como *Schizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces* como huéspedes tales, p.e., *K. lactis, K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarium* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus; yarrowia* (EP 402,226); Phihia pastors (EP 183,070); *Candida; Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa; Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentales*; y hongos filamentosos tales como, p.e., *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium*, y *Aspergillus* como huéspedes tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células huéspedes adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado son derivados de organismos multicelulares, p.e., células de invertebrados que incluyen plantas y células de insectos. Numerosas cepas baculovirales y variantes y células huéspedes de insectos permisivos correspondientes de huéspedes tales como Spodoptera frugiperda (el caterpilar), Aedes aegypti (mosquito), Aedes albopictus (mosquito), Drosophila melanogaster (mosca de la fruta), y Bombix mori han sido identificadas. Una variedad de cepas virales para la transfección son disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de Autographa californica NPV y la cepa Bm-5 de Bombyx mori NPV, y tales virus pueden ser usados como virus aquí de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de Spodoptera fugiperda.

Los cultivos de células de plantas de algodón, maíz, papa, soya, petunia, tomate, tabaco, lema y otras células de plantas también pueden ser utilizadas como huéspedes.

Sin embargo, interés se ha visto más grande en células vertebradas, y propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivos de tejido) lo que se ha hecho un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas de células huéspedes de mamíferos útiles son las células de ovarios de hámster chino, incluyendo CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44,

277

y células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); riñón de mono línea CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embriónico humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivos de suspensión, [Graham et al., *J. Gen Virol. 36*: 59 (1977)]; células de riñon de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células del carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y la línea del hepatoma humano (Hep G2).

Las células huéspedes son transformadas o transfectadas con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritas para la producción de anticuerpos y cultivadas en medios de nutrientes convencionales modificados como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. En adición, los vectores novedosos y las líneas de células transfectadas con copias múltiples de

278

unidades de transcripción separadas por un marcador selectivo son útiles particularmente y preferidas para la expresión de anticuerpos que objetiven M-CFS.

(8) Cultivar las células huéspedes

Las células huéspedes usadas para producir el anticuerpo de esta invención pueden ser cultivadas en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y el Medio Eagle's Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huéspedes. En adición, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), las patentes Estadounidenses Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO90103430; WO 87/00195; o la Patente estadounidense Re. No. 30,985 pueden ser usadas como medios de cultivo para células huéspedes. Cualquiera de estos medios pueden ser suplementadas como sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferian, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como Gentamicina™ como droga), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes a concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o

una fuente de energía equivalente. Cualesquier otros suplementos necesarios pueden también ser incluidos a concentraciones adecuadas que serian conocidos para aquellos basados en la técnica. Las condiciones del cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y aparentemente serán evidentes para aquellos artesanos versados normalmente.

(9) Purificación del anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede ser producido intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretado dentro del medio incluyendo a partir de cultivos microbiales. Si el anticuerpo es producido intracelularmente, como una primera etapa, el desperdicio particulado, sean células huéspedes o fragmentos lisados, es removido, por ejemplo por centrifugación o ultrafiltración. Better et al. Science 240: 1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10: 105 (1990); y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 457-461 (1993) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico del *E. coli*. (*Ver* también, [Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)].

La composición del anticuerpo preparada a partir de células microbiales o de mamíferos puede ser purificada

280

usando, por ejemplo, cromatografía hidroxilapática de catión o cromatografía de intercambio aviar, y cromatografía de afinidad, con cromatografía de afinidad siendo la técnica de purificación preferida. La adecuabilidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de las especies y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que este presente en el anticuerpo. La proteína A puede ser usada para purificar anticuerpos que son basados en cadenas pesadas γ1, γ2, o γ4 humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth. 62*: 1-13 (1983)). La proteína G es recomendada para todos los isotipos de ratón y para la γ3 humana (Guss et al., EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la cual el ligando de afinidad esta sujeto es muy frecuentemente azarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poros controlados o el poli(estirendivinil)benceno permite velocidades de flujo más rápidas y cientos de procesamientos más cortos de los que pueden ser logrados con la azarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H 3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteína tal como el fraccionamiento sobre columna de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™ de cromatografía sobre una resina de intercambio de anión o catión (tal como la columna ácida poliaspártica), cromatoenfocamiento, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de

781

amonio son también disponibles dependiendo del anticuerpo que va a ser recuperado.

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

Debido a que los anticuerpos quiméricos y humanizados son menos inmunogénicos en humanos que los anticuerpos monoclonales de ratón parientes, ellos pueden ser usados para el tratamiento de humanos con mucho menos riesgo de anafilaxis. Así, estos anticuerpos pueden ser preferidos en aplicaciones terapéuticas que involucran la administración in vivo a un humano.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos, en los cuales en los dominios variables Ig de un anticuerpo monoclonal de ratón son fusionados a dominios Ig constantes humanos, pueden ser generados usando procedimientos estándar conocidos en la técnica (Ver Morrison, S. L., et al. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,6841-6855; y, Boulianne, G. L., et al, Nature 312,643-646. (1984)). Aunque algunos anticuerpos monoclonales quiméricos han sido probados como menos inmunogénicos en humanos, los dominios Ig variables de ratón pueden todavía liderar a una respuesta anti-ratón humana significativa.

Los anticuerpos humanizados pueden ser logrados por medio de una variedad de métodos incluyendo, por ejemplo: (1) injertar las regiones determinantes complementarias no humanas (CDRs) en una estructura humana y la región (un proceso llamado en la técnica como humanizar a través de "injertos CDR"), o alternativamente, (2) transplantar los dominios variables no humanos completos, pero "cubriéndolos" con una superficie similar a humana por medio de reemplazar los residuos de superficie (un proceso llamado en la técnica como "revestir"). En la presente invención, los anticuerpos humanizados incluirán tanto anticuerpos "humanizados" y "revestidos". Estos métodos se describen, por ejemplo, en Jones et al., Nature 321: 522 525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65 92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169 217 (1994); y Kettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4(7):773 83 (1991) cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia.

En particular, un anticuerpo de roedor sobre una administración repetida in vivo en hombre sea solo o como un conjugado traerá una respuesta inmune en el receptor contra el anticuerpo del roedor; la respuesta HAMA (Anticuerpo Humano Anti Ratón). La respuesta HAMA puede limitar la efectividad del farmacéutico si la dosificación repetida es requerida. La inmunogénicidad del anticuerpo puede ser

283

283

reducida por la modificación química del anticuerpo con un polímero hidrofólico tal como polietilenglicol o por medio de usar los métodos de ingeniería genética para hacer que la estructura de ligado del anticuerpo sea más similar a humana. Por ejemplo, la secuencia de genes para los dominios variables del anticuerpo de roedor que se liga al CEA puede ser sustituida por los dominios variables de una proteína de mieloma humano, produciendo así un anticuerpo quimérico recombinante. Estos procedimientos son detallados en EP 194276, EP 0120694, EP 0125023, EP 0171496, EP 0173494 y WO 86/01533. Alternativamente las secuencias de genes de los CDR de el anticuerpo de roedor pueden ser aislados o sintetizados y sustituidos por las regiones de secuencia correspondientes de un gen de anticuerpo humano homólogo, produciendo un anticuerpo humano con la especificidad del anticuerpo de roedor original. Estos procedimientos son descritos en la EP 023940, WO90/07861 y W091/09967. Alternativamente un número grande de residuos de superficie de dominio variable del anticuerpo de roedor pueden ser cambiados por aquellos residuos normalmente encontrados en un anticuerpo humano homólogo, produciendo un anticuerpo de roedor que tiene una superficie "revestida" de residuos y que por lo tanto se reconocerá a si misma por el cuerpo humano. Esta enseñanza ha sido demostrada por Parlan et.al. (1991) Mol. Immunol. 28,489.

284

El injerto CDR involucra introducir uno o más de seis CDR desde los dominios Ig variables de cadena liviana y cadena pesada de ratón en cuatro regiones de estructura apropiadas de dominios Ig variables humanos también llamada injerto CDR. Esta técnica (Riechmann, L., et al., Nature 332,323 (1988)), utiliza las regiones de estructura conservadas (FR1-FR4) como un andamio para soportar los lazos CDR que son los contactos primarios con el antígeno. Una desventaja del injerto CDR, sin embargo, es que este puede resultar en un anticuerpo humanizado que tiene una afinidad de ligado sustancialmente inferior a la del anticuerpo de ratón original, debido a que los aminoácidos de la región de estructura pueden contribuir con el ligado del antígeno, y debido a que los aminoácidos de los lazos CDR pueden influenciar en la asociación de los dos dominios variables Ig. Para mantener la afinidad del anticuerpo monoclonal humanizado, la técnica de injertar CDR puede ser mejorada escogiendo regiones de estructura humana que se parezcan más cercanamente a las regiones de estructura del anticuerpo de ratón original, y por mutagénesis dirigida a sitio de aminoácidos únicos dentro de la estructura o del CDR ayudados por modelamiento por computador del sitio de ligado del antígeno (por ejemplo, Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152,2968-2976).

Un método para humanizar anticuerpos comprende alinear las secuencias de cadena pesada y liviana no humanas con las

285

secuencias de cadena liviana y pesada humanas, seleccionar y reemplazar la estructura no humana con una estructura humana con base en tal alineamiento, hacer el modelado molecular para predecir la conformación de la secuencia humanizada y comparara con la conformación del anticuerpo pariente. Este proceso es seguido por mutación inversa repetida de los residuos en la región CDR lo que altera la estructura de los CDR hasta que la conformación predicha del modelo de secuencia humanizada se aproxima cercanamente a la conformación de los CDR no humanos del anticuerpo no humano pariente. Tales anticuerpos humanizados pueden ser derivados adicionalmente para facilitar la toma y clarificación, por ejemplo, vía receptores Ashwell (Ver, p.e., Patentes Estadounidense Nos. 5,530,101 y 5,585,089 dichas patentes son incorporadas aquí como referencia).

Un número de humanizaciones de anticuerpos monoclonales de ratón por diseño racional han sido reportadas (Ver, por ejemplo, 20020091240 publicada Julio 11,2002, WO 92/11018 y la Patente Estadounidense No., 5,693,762, la Patente Estadounidense No. 5,766,866.

Variantes de la secuencia de aminoácido

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se llama "mutagénesis de

286

barrido de alanina", como se describió por Cunningham y Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos objetivo son identificados (p.e., residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y reemplazados por u aminoácido cargado negativamente o neutro (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácido que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones son entonces refinadas por medio de introducir variables adicionales u otras variantes en o para los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácido es predeterminado, la naturaleza de la mutación per se no requiere ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el desempeño de la mutación en un sitio dado, el barrido o la mutagénesis aleatoria de ala es conducida en el codón objetivo o la región objetivo y los variantes del anticuerpo expresados son seleccionados para en cuanto a su actividad deseada. Las inserciones de las secuencias de aminoácido incluyen fusiones de terminal amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cientos o más residuos, lo mismo que inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Ejemplos de inserciones de terminal incluyen un anticuerpo con un residuo metionil en le terminal N o el anticuerpo (incluyendo fragmento del anticuerpo) fusionado a una etiqueta de epítopo o a un epítopo receptor natural. Otras

287

variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión a un polipéptido lo que incrementa la vida promedio del suero del anticuerpo, por ejemplo en el terminal N o en el terminal C.

El termino "epítopo etiquetado" se refiere al anticuerpo fusionado a una etiqueta de epítopo. El polipéptido de etiqueta de epítopo tiene suficientes residuos para suministrar un epítopo contra el cual un anticuerpo puede ser hecho, aunque es lo suficientemente corto de modo que no interfiere con la actividad del anticuerpo. La etiqueta de epítopo preferiblemente es suficientemente única de modo que el anticuerpo que esta contra ella no reaccione de manera sustancialmente cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos de etiqueta adecuados generalmente tienen por lo menos 6 residuos de aminoácido y usualmente entre cerca de 8 a 50 residuos de aminoácido (preferiblemente entre 9 y 30 residuos). Ejemplos incluyen el polipéptido de etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.* *8*: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y el 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 como anticuerpos de ella [Evan et al., *Mol. Cell. Biol.* 5 (12): 3610-3616 (1985)]; y la glicoproteína D del virus del Herpes Simplex (gD) su etiqueta y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering 3 (6): 547-553 (1990)]. Otras etiquetas ejemplares son una secuencia de poli-histidina, generalmente alrededor de seis residuos de histidina, que permiten el aislamiento de un compuesto así

288

marcado usando quelación de níquel. Otras etiquetas, tales como la etiqueta FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY), bien conocida y usada rutinariamente en la técnica, también están involucradas por la invención.

Como se usa aquí, el término "epítopo de ligado de receptor natural" se refiere a un epítopo de la región Fc de un molécula IgG (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, o IgG_4) que es responsable de incrementar la vida promedio del suero in vivo de la molécula IgG.

Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula del anticuerpo removida y un residuo diferente insertado en su lugar. La mutagénesis sustitucional dentro de cualquier hipervariable o regiones CDR o regiones de estructura es contemplada. Las sustituciones conservadoras se muestran el Tabla 1. la sustitución más conservadora es encontrada bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones resultan en ningún cambio en la actividad biológica, entonces más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a las clases de aminoácido, puede ser introducida y los producto seleccionados.

289

TABLA 1

Original	Ejemplar	Sustituciones de residuo preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	arg
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala;	leu
	phe;	norleucina
Leu (L)	norleucina; ile; val;	ile
	met; ala; phe	
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	Ala	
Ser (S)	Thr	
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile, leu; met; phe;	leu
	ala; norleucina	

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo son llevadas a cabo por medio de seleccionar las sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lamina o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el tamaño de la cadena lateral. Los residuos que ocurren

190

naturalmente son divididos en grupos con base en las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofílicos neutrales: cys, ser, thr;

(3) acídicos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que incluyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: tro, tyr, phe.

Las instituciones conservadoras involucran el reemplazo de un aminoácido con otro miembro de su clase. Las instituciones no conservadoras involucran el reemplazo de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no involucrado en le mantenimiento de la conformación adecuada de la variante del anticuerpo monoclonal, humano, humanizado, tratado por Human Engineered™ también puede ser sustituido, generalmente con cerina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación al arranque. De manera contraria, el o los enlaces de cisteína pueden ser agregados al anticuerpo para mejorar su estabilidad (Particularmente en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

291

La maduración de la afinidad involucra preparar y tamizar las variantes de anticuerpo que tienen sustituciones dentro del CDR de un anticuerpo pariente y seleccionar las variantes que tienen propiedades biológicas mejoradas tales como afinidad de ligado relativa al anticuerpo pariente. Una manera conveniente para generar tales variantes sustitucionales es la maduración de la afinidad usando una visualización de pagos. Brevemente, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) son mutados para generar todas las sustituciones amino posibles en cada sitio. Las variables del anticuerpo aquí generadas son visualizadas de una manera monovalente desde partículas fago filamentosos como fusiones al producto gene III de M13 empacado con cada partícula. Las variantes de visualización pago son entonces tamizadas en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de ligado).

La mutagénesis de barrido de alanina puede ser llevada a cabo para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuye significativamente al ligado del antígeno. Alternativamente, o en adición, esto puede beneficiar para analizar una estructura de cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo alas técnicas elaboradas aquí. Una vez que tales variantes son generadas, el panel de variantes es sometido a tamizado

792

como se describe aquí y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden ser seleccionados para un desarrollo adicional.

Las variantes de anticuerpo también pueden ser producidas que tengan un patrón glicosilación modificado relativo al anticuerpo padre, por ejemplo, eliminando uno o más partes del carbohidrato encontradas en el anticuerpo, y/o adicionando uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de los anticuerpos se hace típicamente en enlace N o enlace O. En enlace N se refiere a la sujeción de la parte de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de los tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la sujeción enzimática como partes de carbohidrato a la cadena lateral asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Así, los sitios de glicosilación enlace N pueden ser agregados a un anticuerpo por medio de alterar la secuencia de aminoácido de modo que esta contenga uno o más de estas secuencias tripéptidos. La glicosilación enlazada en O se refiere a la sujeción de uno o más azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente

293

serina o treonina, aunque 5-hidroxiprolina o 5- hidroxilisina también puede ser usado. Los sitios de glicosilación enlazados en O pueden ser agregados a un anticuerpo por medio de insertar o sustituir uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original. Como vía de ejemplo, los aminoácidos de RX1 en las posiciones 41-43 de la Figura 4A (NGS) pueden ser retenidos. Alternativamente, solamente los aminoácidos 41 y 42 (NG) pueden ser retenidos.

Usualmente, las variantes de secuencia de aminoácido del anticuerpo Human Engineered™ tendrán una secuencia de aminoácido que tenga por lo menos 60% de identidad de la secuencia de aminoácido con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original Human Engineered™ de cualquiera de las cadenas liviana o pesada (por ejemplo, como en cualquiera de las Figuras 19B a 22B) más preferiblemente por lo menos 80%, más preferiblemente por lo menos 85%, más preferiblemente por lo menos 90%, y más preferiblemente por lo menos 95%, incluyendo por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, y 100%. La identidad o homología con respecto a ésta secuencia está definida aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidato que son idénticos con los Residuos Human Engineered™, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora (como se definió

294

en la Tabla 1 anterior) como parte de la identidad de secuencia. Ninguno de los terminal N, terminal C, o extensiones internas, eliminaciones, o inserciones dentro de la secuencia de un anticuerpo deberán ser tomadas como que afecten de identidad o homología de la secuencia. Así, la identidad de la secuencia puede ser determinada por métodos estándar que son comúnmente usados para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Usando programas de computador tales como BLAST o FASTA, dos polipéptidos son alineados para case óptimo de sus respectivos aminoácidos (sea a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias, o a lo largo de una porción pre-determinada de una o ambas secuencias). Los programas suministran un castigo de apertura por defecto y un castigo por espacio por defecto, y una matriz de registro tal como PAM 250 [una matriz de registro estándar; ver Dayhoff et al., en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978)] puede ser usado en conjunto con el programas de computador. Por ejemplo, el porcentaje de identidad que entonces puede ser calculado como: el número total de cases idénticos multiplicado por 100 y luego dividido por la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro del espacio que se ha comparado y el número de espacios introducidos dentro de la secuencia más larga para poder alinear las dos secuencias.

295

Otras modificaciones del anticuerpo se contemplan. Por ejemplo, pueden ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de modo que se promueva la efectividad del anticuerpo al tratar el cáncer, por ejemplo Por ejemplo el residuo cisteína pueden ser introducidos en la región Fc, permitiendo así la formación de enlace de intercadena de disulfuro en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una citotoxicidad celular dependiente de matar células mediadas por complemento de anticuerpo (ADCC). Ver Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada pueden también ser preparados usando enlazadores cruzados heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., Cáncer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo puede ser modificado por ingeniería genética el cual tiene regiones Fc duales y puede por lo tanto tener una lisis de complemento mejorada y capacidades ADCC. Ver Stevenson et al., *Anti-Cáncer Drug Design* 3: 219-230 (1989). Adicionalmente, se ha mostrado que las secuencias dentro del CDR pueden causar que un anticuerpo se ligue al MHC Clase II y dispare una respuesta de célula T ayudadora no deseada. Una sustitución conservadora puede permitir que el anticuerpo retenga la actividad del hígado y sin embargo libere su actividad para disparar una respuesta de célula T no deseada. Ver también Steplewski et al., Proc

296

Natl Acad Sci U S A. 1988; 85 (13): 4852-6, incorporada aquí como referencia en su totalidad, en donde se describen anticuerpos quiméricos en donde una región variable de murino fue unida con regiones humanas constante gamma 1, gamma 2, gamma 3, y gamma 4.

En ciertas modalidades de la invención, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intàcto, para incrementar la penetración en el tumor, por ejemplo En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo para poder incrementar su vida promedio en suero, por ejemplo, agregando moléculas tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros de polisacáridos, a fragmentos de anticuerpo para incrementar su vida promedio. Esto puede también lograrse, por ejemplo, por medio de la incorporación de un receptor natural que se liga a un epítopo en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, por la mutación de la región apropiada en el fragmento del anticuerpo o por medio de incorporar el epítopo en una etiqueta de péptido que es luego fundida al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el medio, por ejemplo, por síntesis de ADN o de péptido) (ver, por ejemplo, WO96/32478).

El epítopo que se liga a un receptor natural preferiblemente constituye una región en donde cualquiera de uno o más residuos de aminoácidos de uno o dos lazos de un

297

dominio Fc son transferidos a una posición análoga del fragmento del anticuerpo. Aún más preferiblemente, tres o más residuos de uno o dos lazos del dominio Fc son transferidos. Todavía más preferido, el epítopo es tomado del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de un IgG) y es transferido al CH1, CH3, o la región VH, o más de una de tales regiones, del anticuerpo. Alternativamente, el epítopo es tomado del dominio CH2 de la región Fc y es transferido a la región C.sub.L o la región V.sub.L, o ambas, del fragmento del anticuerpo. Ver también las solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478 que describen variantes de Fc y sus interacciones con el receptor natural.

Así, anticuerpos de la invención pueden comprender una porción Fc humana, una porción Fc de consenso humano o una variante de ellas para retener la habilidad para interactuar con el receptor natural Fc, incluyendo las variantes en las cuales las cisteínas involucradas en enlaces de disulfuro son modificadas o removidas, y/o en la cual se agrega un met al terminal N y/o uno o más 2° aminoácidos del terminal N son removidos, y/o la regiones que interactúan con complemento tal como el sitio de enlace Clq son removidos, y/o el sitio ADCC es removido [ver, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992)].

Estudios previos mapearon el sitio de enlace en IgG humano y de murino para el FcR principalmente a la región de

bisagra interior compuesta de los residuos de IgG 233-239. Otros estudios propusieron segmentos adicionales más amplios, por ejemplo GIy316-Lys338 para el receptos Fc humano I, Lys274-Arg301 y Tyr407-Arg416 para el receptor Fc III, o se encontró nuevos residuos específicos por fuera de la bisagra inferior, por ejemplo Asn297 y Glu318 para IgG2b de murino que interactúa con el receptor Fc de murino II. El reporte de la estructura de cristal de 3.2-Å del fragmento Fc de IgG1 humano con el receptor Fc humano IIIA delineado por los residuos de IgG1 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, y Ala327-Ile332 como involucrados en el ligado al receptor Fc IIIA. Se ha sugerido con base en la estructura del cristal que en adición a la bisagra inferior (Leu234-Gly237), los residuos en los lazos Fc de los dominios IgG CH2 (residuos 326-330) y BC (residuos 265-271) pueden jugar un papel en el ligado al receptor Fc IIA. Ver Shields et al., J. Biol. Chem., 276 (9): 6591-6604 (2001), incorporado como referencia aquí en su totalidad. La mutación de residuos dentro de los sitios de ligado del receptor Fc puede resultar en una función efectora alterada, tal como la actividad ADCC o CDC, o su vida media alterada. Como se describió anteriormente, las mutaciones potenciales incluyen inserciones, eliminaciones o sustituciones de uno o más residuos, incluyendo substitución con alanina, una substitución conservadora, una sustitución no conservadora, o reemplazos con una residuo de aminoácido correspondiente en la misma posición de una subclase de IgG diferente (por

299

ejemplo reemplazar un residuo de IgG1 con un residuo correspondiente IgG2 en esa posición).

Shields et al., reportó que los residuos de IgG1 involucrados en ligar a los receptores Fc humanos están localizados en el dominio CH2 próximo a la bisagra y caen en dos categorías como sigue: 1) posiciones que pueden interactuar directamente con todos los FcR incluye Leu234-Pro238, Ala327, y Pro329 (y posiblemente Asp265); 2) posiciones que influyen en la naturaleza de carbohidrato o posición de carbohidrato que incluye Asp265 y Asn297. Los residuos de IgG1 adicionales que afectaron el ligado al receptor Fc II son los siguientes: (efecto más grande) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298, y (efecto menor) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378, y Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A y D270A redujeron el ligado. En adición a los residuos identificados anteriores para todos los FcR, residuos de IgG1 adicionales que reducen el ligado al receptor Fc IIIA en 40% o más son los siguientes: Ser239, Ser267 (Gly solamente), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338, y Asp376. Las variantes que mejoraron el ligado al FcR IIIA incluyen T256A, K290A, S298A, E333A, K334A, y A339T. Lys414 mostró una reducción del 40% en el ligado para FcRIIA y FcRIIB, Arg416 un 30% de reducción para FcRIIA y FcRIIIA, Gln419 un 30% de reducción para FcRIIA y un

300

40% de reducción para FcRIIB, y Lys360 un 23% de mejora para FcRIIIA. Ver también Presta et al., Biochem. Soc. Trans. (2001) 30,487-490.

Por ejemplo, la Patente de Estadounidense No. 6,194, 551, incorporada aquí como referencia en su totalidad describe variantes con función efectora alterada que contiene mutación en la región Fc del IgG humano, en la posición de aminoácido 329, 331 o 322 (usando la numeración Kabat), algunos de los cuales mostraron un ligado reducido a C1q o actividad CDC. Como otro ejemplo, la Patente Estadounidense No. 6,737, 056, incorporada aquí como referencia en su totalidad, describe variantes con efectores alterados o ligado de Fc-gamma-receptor que contiene mutaciones en la región FC del IgG humano, en las posiciones de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 (usando la numeración Kabat), algunos de los cuales muestran estilos de ligado al receptor asociados con actividad ADCC o CDC reducida. De estos, una mutación en la posición de aminoácido 238, 265, 269, 270, 327 o 329 están establecidas que reducen el ligado al FcRI, una mutación en la posición de aminoácido 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373,

301

376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 son establecidas en cuanto a que reducen el ligado al FcRII, y una mutación en la posición de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 establece una reducción en el ligado al FcRIII.

La Patente Estadounidense No. 5,624, 821, incorporada como referencia aquí en su totalidad, reporta que la actividad de ligado Clq de un anticuerpo de murino puede ser alterado por medio de mutar los residuos de aminoácido 318, 320 o 322 de la cadena pesada y que reemplazan al residuo 297 (Asn) resulta en la remoción de una actividad lítica.

La Publicación de solicitud Estadounidense No. 20040132101, incorporada aquí como referencia en su totalidad, describes variantes con mutaciones en las posiciones de aminoácidos 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328, o 332 (usando la numeración Kabat) o posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, o 332 (usando la numeración Kabat), de las cuales las mutaciones en la posiciones 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330, o 332 puede reducir la actividad ADCC o reducir el ligado a un receptor gamma Fc.

302
302

Chappel et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88 (20): 9036-40, incorporada aquí como referencia en su totalidad, reporta que la actividad citofílica del IgG1 es una propiedad intrínseca de su dominio CH2 de la cadena pesada. Mutaciones de punto único de cualquiera de los residuos de aminoácidos 234-237 de IgG1 bajaron o abolieron significativamente su actividad. La sustitución de todos los residuos 234-237 (LLGG) en IgG2 y IgG4 fueron requeridos para restaurar la actividad de ligado completa. Un anticuerpo de IgG2 que contiene la secuencia ELLGGP completa (residuos 233-238) se observó como más activa que la IgG1 tipo natural.

Isaacs et al., J Immunol. 1998; 161 (8): 3862-9, incorporada aquí como referencia en su totalidad, reporta que las mutaciones dentro de un motivo crítico para el ligado Fc gammaR (glutamato 233 a prolina, leucina/fenilalanina 234 a valina, y leucina 235 a alanina) inquirió completamente el vaciado de las células objetivo. La mutación del glutamato 318 a alanina eliminó la función efectora del IgG2b de ratón y también redujo la potencia del IgG4 humano.

Armour et al., Mol Immunol. 2003; 40 (9): 585-93, incorporada como referencia aquí en su totalidad, identificó variantes de IgG1 que reaccionan con el receptor activamente, FcgammaRIIa, por lo menos 10 veces menos eficientemente que el IgG1 tipo silvestre pero cuyo ligado al receptor

inhibitorio, FcgammaRIIb, es solamente reducido cuatro veces. Las mutaciones fueron hechas en la región de los aminoácidos 233-236 y/o las posiciones de aminoácidos 327, 330 y 331. Ver también WO 99/58572, incorporada como referencia aquí en su totalidad.

Xu et al., J Biol Chem. 1994; 269 (5): 3469-74, incorporada como referencia aquí en su totalidad, reporta que mutar IgG1 Pro331 a Ser disminuyó marcadamente el ligado C1q y virtualmente eliminó la actividad lítica. En contraste la sustitución de Pro para Ser331 en IgG4 otorgó actividad parcial lítica (40%) a la variante IgG4 Pro331.

Schuurman et al., Mol Immunol. 2001; 38 (1) : 1-8, incorporada como referencia aquí en su totalidad, reporto que mutar una de las cisteínas bisagra involucradas en la formación de enlaces intercadena pesada, Cys226, en cerina resultó en un enlace de intercadena pesada más estable. Mutar la secuencia de la bisagra IgG4 Cys-Pro-Ser-Cys en la secuencia de bisagra IgG1 Cys-Pro-Pro-Cys también estabiliza marcadamente la interacción covalente entre las cadenas pesadas.

Angal et al., Mol Immunol. 1993; 30 (1): 105-8, incorporada como referencia aquí en su totalidad, reportó que las mutaciones de serina en la posición de aminoácido 241 in IgG4 a prolina (encontrada en esa posición en IgG1 y IgG2)

304

llevó a la producción de un anticuerpo homogéneo, lo mismo que una vida promedio en suero extendida y mejora la distribución del tejido comparada IgG4 quimérico original.

Anticuerpos humanos y Human Engineered™

Human Engineering™

La Human Engineering™ de dominios de variables de anticuerpos han sido descritas por Studnicka [Ver, por ejemplo, Studnicka et al. Patente Estadounidense No. 5,766, 886; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)] como un método para reducir la inmunogenicidad mientras que se mantiene la actividad del hígado o de las moléculas del anticuerpo. De acuerdo con el método, cada aminoácido de la región variable se le ha asignado un riesgo de substitución. Las sustituciones de aminoácido se distinguen por una de tres categorías: (1) cambios de bajo riesgo son aquellos que tienen el mayor potencial para reducir la inmunogenicidad con por lo menos la oportunidad de romper el ligado del antígeno; (2) cambios de riesgo moderado son aquellos que podrían reducir la inmunogenicidad pero tienen una mayor oportunidad de el ligado del antígeno o el doblado de la proteína; (3) residuos de riesgo alto son aquellos que son importantes para el ligado o para mantener la estructura del anticuerpo y conllevan un alto riesgo de que el ligado del antígeno o el doblado de la proteína serán afectados. Debido al papel

305

estructural tridimensional de las prolinas, las modificaciones en las prolinas son consideradas generalmente como por lo menos de riesgo moderado en cuanto a cambios, aún si la posición es típicamente una posición de bajo riesgo.

Las regiones variables de las cadenas liviana y pesada de un anticuerpo de roedor son Human Engineered™ como sigue para sustituir los aminoácidos humanos en las posiciones determinadas que probablemente no vayan a tener efectos adversos sea en el ligado del antígeno o en el doblado de la proteína, pero probablemente reducen la inmunogenicidad en un ambiente humano. Los residuos de aminoácido que están en "bajo riesgo" y que son candidatos para modificación de acuerdo con el método son identificados por el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del roedor con una secuencia de región variable humana. Cualquier región variable humana puede ser usada, que incluye una secuencia VH o VL individual o una secuencia VH o VL de consenso humana o una secuencia de línea germinal humana de consenso o individual. Los residuos de aminoácidos en todas las posiciones de bajo riesgo, pueden ser cambiados. Por ejemplo, en cada posición de bajo riesgo en donde los residuos de aminoácido de murino o humanos alineados difieren, una modificación del aminoácido es introducida para reemplazar el residuo del roedor con el residuo humano. Alternativamente, los residuos de aminoácido de todas las posiciones de bajo riesgo y en cualquier número de posiciones

de riesgo moderado pueden ser cambiados. Idealmente, para lograr la menor inmunogenicidad todas las posiciones de bajo y moderado riesgo son cambiadas de la secuencia de roedores a secuencia humana.

Los genes sintéticos que contienen regiones variables de cadena liviana y/o pesada modificadas son construidos y envasados en regiones constantes de cadena pesadaY y/o cadena liviana kappa. Cualquier regiones constantes de cadena pesada o cadena liviana humanas pueden ser usadas en combinación con las regiones variables del anticuerpo Human Engineered™ incluyendo IgA (de cualquier subclase, tal como IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (de cualquier subclase, tal como IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4), o IgM. Los genes de cadena pesada y liviana humanos son introducidos dentro de las células anfitrionas tales como células de mamíferos, y los productos de inmunoglobulina recombinante resultante son obtenidos y caracterizados.

Anticuerpo humanos de animales transgénicos

Los anticuerpos humanos para M-CSF también pueden ser producidos usando animales transgénicos que no tengan producción de inmunoglobulina endovenosa y que son tratados por ingeniería para contener localizaciones de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, WO 98/24893 describe animales transgénicos que tienen un locus Ig en donde el

animal no produce inmunoglobulinas endovenosas funcionales debido a la inactivación de las localizaciones de cadena pesada y liviana endovenosas. La WO 91/741 también describe anfitriones mamíferos no primates transgénicos capaces de montar una respuesta inmune a un inmunogen, en donde los anticuerpos tienen regiones variables y/o constantes de primates, y en donde las localizaciones que codifican la inmunoglobulina endógena son sustituidas o inactivadas. La WO 96/30498 describe el uso del sistema Cre/Lox para modificar el locus de inmunoglobulina en un mamífero, de modo que se reemplaza todo o una porción de la región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificada. La WO 94/02602 describe anfitriones de mamífero no humano que tienen localizaciones de Ig endogenoso inactivadas y localizaciones de Ig humano funcionales. La Patente Estadounidense No. 5,939, 598 describe métodos para hacer ratones transgénicos en los cuales los ratones carecen de cadenas pesadas endovenosas, y expresan un locus de inmunoglobulina exogenoso que comprende una o más regiones constantes xenogenicas.

Usando un animal transgénico descrito anteriormente, una respuesta inmune puede ser producida a una molécula antigénica seleccionada, y las células que producen anticuerpos pueden ser removidas del animal y usadas para producir hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos. Los protocolos de inmunización, adyuvantes, y

308

similares son conocidos en la técnica y son usados en la inmunización de, por ejemplo, un ratón transgénico como se describió en la WO 96/33735. Esta publicación describe anticuerpos monoclonales contra una variedad de moléculas antigénicas que incluyen IL 6, IL 8, TNFa, CD4 humano, L selectina, gp39, y toxina de tétano. Los anticuerpos monoclonales pueden ser ensayados en cuanto a su habilidad para inhibir o neutralizar la actividad biológica o el efecto fisiológico de la correspondiente proteína. La WO 96/33735 describe que los anticuerpos monoclonales contra el IL-8, derivados de células inmunes de ratones transgénicos inmunizados con IL-8, bloquearon las funciones inducidas por IL-8 de neutrofilos. Los anticuerpos humanos monoclonales con especificidades para el antígeno usado para inmunizar animales transgénicos son también descritos en la WO 96/34096 y Solicitud de Patente Estadounidense No. 20030194404; y la Solicitud de Patente Estadounidense No. 20030031667).

Ver también Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7: 33 (1993); y la Patente Estadounidense No. 5,591, 669, la Patente Estadounidense No. 5,589, 369, la Patente Estadounidense No. 5,545, 807; y la Solicitud de Patente Estadounidense No. 20020199213. La Solicitud de Patente Estadounidense No. 20030092125 describe métodos para provocar la respuesta inmune de un animal a un epítopo deseado. Los anticuerpos

309

humanos también puede ser generados por células B activadas *in vitro* (ver Patentes Estadounidenses Nos. 5,567, 610 y 5,229, 275).

Anticuerpos humanos a partir de la tecnología de visualización fago

El desarrollo de tecnologías para hacer repertorios de genes de anticuerpos humanos recombinantes y la visualización de los fragmentos de anticuerpo codificados sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, ha provisto medios para hacer anticuerpos humano directamente. Los anticuerpos producidos por la tecnología fago, son producidos como fragmentos que ligan antígeno usualmente fragmentos Fv o Fab en bacterias y procedimiento lo tanto carecen de funciones efectoras. Las funciones efectoras pueden ser introducidas por una de dos estrategias: Los fragmentos pueden ser tratados por ingeniería genética sea en anticuerpos completos para la expresión en células de mamíferos, o en fragmentos de anticuerpo biespecíficos con un segundo sitio de ligado capas de disparar una función expectora.

Típicamente, los fragmentos Fd (V_h-C_h1) y los de cadena liviana (V_L-C_L) de los anticuerpos son clonados separadamente por PCR y aleatoriamente recombinados en librerías visualización fago combinatorios, que pueden entonces ser seleccionadas en cuanto a ligado, a un antígeno particular.

Los fragmentos de Fab son expresados sobre la superficie del fago, es decir, enlazados físicamente a los genes que las codifican. Así, la selección de Fab por ligado de antígeno co-selecciona para las secuencias codificadores de Fab, que pueden ser amplificadas subsecuentemente. Por medio de varias rondas del ligado de antígeno y re-amplificación, un procedimiento llamado de encestamiento, el Fab específico para el antígeno es enriquecido y finalmente aislado.

En 1994, una enseñanza para la humanización de anticuerpos, llamada "selección guiada", fue descrita. La selección guiada utiliza la potencia de la técnica de visualización fago para la humanización de anticuerpo monoclonal de ratón (Ver Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12,899-903 (1994)). Para esto, el fragmento Fd del anticuerpo monoclonal de ratón puede ser visualizado en combinación con una librería de cadena liviana humana, y la librería de Fab híbrida resultante puede entonces ser seleccionada con el antígeno. El fragmento Fd de ratón por lo tanto suministra una plantilla para guiar la selección. Subsecuentemente, las cadenas livianas humanas seleccionadas son combinadas con una librería de fragmento Fd humano. La selección de la librería resultante produce Fab humano completamente.

Una variedad de procedimientos han sido descritos para derivar anticuerpos humanos de librerías de visualización

311

fago (Ver, por ejemplo, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991); Las patentes Estadounidenses Nos. 5,565,332 y 5,573,905; Clackson, T., y Wells, J. A., TIBTECH 12,173-184 (1994)). En particular, la selección y evolución in vitro de anticuerpos derivados de librerías de visualización fagos se han convertido en una herramienta poderosa (Ver Burton, D. R., y Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57,191-280 (1994); y, Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12,433-455 (1994); La solicitud de Patente Estadounidense. No. 20020004215 y la W092/01047; La solicitud de Patente Estadounidense No. 20030190317 publicada en Octubre 9,2003 y la Patente Estadounidense No. 6,054,287; la Patente Estadounidense No. 5,877,293.

Los métodos de Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," En Biología Molecular, Visualización de anticuerpo por fago: Methods and Protocols 178: 187-193, y la solicitud de Patente Estadounidense No. 200120030044772 publicada en Marzo 6,2003 describe métodos para tamizar librerías de anticuerpo espesados por fago u otras moléculas del ligado por levantamiento de captura, un método que involucra la inmovilización de las moléculas de ligado candidatas en un soporte sólido.

Los productos de anticuerpo pueden ser seleccionados en cuanto actividad y para su adaptabilidad en los métodos de

tratamiento de la invención usando ensayos según se describió en la sección titulada "Métodos de Tamizado" aquí o usando cualesquier ensayos conocidos en la técnica.

tras modificaciones covalentes

Las modificaciones covalentes del anticuerpo son también incluidas dentro del alcance esta invención. Ellas pueden hacerse por síntesis química o por división enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo son introducidas en la técnica por medio de hacer reaccionar residuos de aminoácido objetivados del anticuerpo con un agente derivador orgánico que es capas de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los residuos de terminal N o C.

Los residuos de cisteinilo más comunes se hacen reaccionar con α-haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo son también derivados por medio de la reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo-β-(5-imidozoil) propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metilo 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

313

Los residuos de histidilo son derivados por la reacción con dietilpirocarbonato a un pH entre 5.5 a 7.0 debido a que este agente es relativamente especifico para la cadena lateral de histidilo. Bromuro de para-bromofenacilo también es util; la reacción se lleva a cabo preferiblemente en cacodilato de sodio al 0.1 M a un pH de 6.0.

Lisinilo y residuos de terminal amino se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico o carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de reversar la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa.-amino- incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfonico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos de arginilo son modificados por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y nihidrina. La derivación de residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al pK_a alto del grupo funcional guanidina. Más aun, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina lo mismo que con el grupo epsilon-amino de arginina.

La modificación especifica de residuos de tirosila pueden ser hechos, con particular interés en marcadores espectrales de introducción en residuos de tirosilo por medio de la reacción con compuestos de diazonio aromático o tetranitrometano. Mas comúnmente, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro respectivamente. Los residuos de tirosilo son yodados usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para uso en radioinmunoensayos.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) son modificados selectivamente por la reacción con carbodiimidas (R-N. dbd. C. dbd. N-R'), en donde R y R' son grupos alquilo diferente, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Más aún los residuos de aspartilo y glutamilo son convertidos a asparaginilo y residuo de glutaminilo por medio de la reacción con iones de amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparginilo son deaminados frecuentemente a los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Estos residuos son deamidados bajo condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

315

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serila o treonilo, la metilación de los grupos alfa.-amino de lisina y arginina, y cadenas laterales de histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina de terminal N, y amidación de cualquier grupo carboxilo de terminal C.

Otro tipo de modificación covalente involucra el acoplamiento químico o enzimático de glicosidas al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos en que ellos no requieren la producción del anticuerpo en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación enlazada en N o en O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, los azucares pueden ser sujetados a (a) la arginina y la histidina, (b) grupos libres carboxilos, (c) grupos libres de sulfihidrilo tales como aquellos de cisteina, (d) grupos libres de hidroxilo tales como aquellos de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como aquellos de fenialanina, tirosina, o triptofan, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos son descritos en la WO87/05330 publicada el 11 de Septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

316

La remoción de cualesquier partes de carbohidratos presentes en el anticuerpo pueden ser llevados a cabo química o enzimáticamente. La deglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto de ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la división de la mayor parte o de todos los azucares excepto el azúcar enlazado (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja el anticuerpo intacto. La deglicosilación química como se describió por Hakimuddin, et al. Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) y por Edge et al. Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La división enzimática de partes de carbohidratos sobre anticuerpos puede ser llevada a cabo por medio del uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas según se describió por Thotakura et al. Meth. Enzymol. 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende enlazar el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteinaceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioles polioxietilados, sorbitol polioexietilado, glucosa polioiexietilada, glicerol polioxietilado, polioxialquilenos, o polímeros de polisacaridos tales como dextran. Tales métodos con conocidos en la técnica, Ver, p.e., Las Patente Estadounidenses Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192, 4,179,337, 4,766,106, 4,179,337, 4,495,285, 4,609,546 o la EP 315 456.

317

Terapia de genes

El suministro de un anticuerpo terapéutico a células apropiadas puede efectuarse por medio de terapia de genes ex vivo, in situ, o in vivo por medio del uso de cualquier enseñanza adecuada conocida en la técnica, incluyendo por medio del uso de métodos de transferencia física de ADN (p.e., liposomas o tratamientos químicos) o por medio del uso de vectores virales (p.e., adenovirus, virus adenoasociados, o un retrovirus). Por ejemplo, para terapia in vivo, un ácido nucleico que codifica al anticuerpo deseado, sea solo o en conjunto con un vector, liposoma o precipitado puede ser inyectado directamente en le sujeto, y en lagunas modalidades puede ser inyectado en el sitio en donde la expresión del compuesto de anticuerpo es deseada. Para el tratamiento ex vivo, las células del sujeto son removidas, el ácido nucleico es introducido dentro de estas células, y las células modificadas son regresadas al sujeto sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que son implantadas dentro del paciente. Ver, por ejemplo las Patentes Estadounidenses No. 4,892,538 y 5,283,187. Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas pueden depender de si el ácido nucleico es transferido en células cultivadas in vitro, o in vivo en las células del huésped propuesto. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en

células de mamíferos in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextran, y precipitación de fosfato de calcio. Un vector comúnmente usado para suministro ex vivo de un ácido nucleico es un retrovirus.

Otras técnicas de transferencia de ácido nucleico in vivo incluye la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del Herpes simplex I, o virus adeno-asociados) y sistemas basados en lípidos. El ácido nucleico y el agente de transfección son asociados opcionalmente con una micropartícula. Agentes de transfección ilustrativos incluyen el fosfato de calcio o el cloruro de calcio en co-precipitación, la transfección mediada con DEAE-dextran, amonio anfifilo cuaternario DOTMA ((dioleoiloxipropil) bromuro de trimetilamonio, comercializado como Lipofectin por GIBCO-BRL))(Felgner et al, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone et al. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 6077-6081); diésteres de glutamato lipofílico con cabezas de trimetilamonio pendientes (Ito et al. (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023,124-132); los lípidos parientes metabolizables tales como el lípido catiónico dioctadecilamido glicilespermina (DOGS, Transfectam, Promega) y etanolamilespermina dipalmitoiilfosfatidilo (DPPES) (J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27,5861-5864; J. P. Behr et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86,6982-6986); sales de amonio cuaternario metabolizables (DOTB, metilsulfato de N-

1([2,3-dioleoiloxi]propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) (Boehringer Mannheim), polietileneimina (PEI), esteres de dioleoilo, ChoTB, ChoSC, DOSC) (Leventis et al. (1990) Biochim. Inter. 22,235-241); 3beta [N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] ccolesterol (DC-Chol), etanolamina de dioleoilfosfatidilo (DOPE)/3beta [N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil] colesterolDC-Chol en mezclas de uno a uno (Gao et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065,8-14), espermina, espermidina, lipopoliaminas (Behr et al., Bioconjugate Chem, 1994,5: 382-389), polilisinas lipofílicas (LPLL) (Zhou et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939,8-18), hidróxido de [[(1,1,3,3-tetrametilbutil)cre-soxi]etoxi]etil] dimetilbenzilamonio (hidróxido de DEBDA) con exceso de fosfatidilcolina/colesterol (Ballas et al., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939,8-18), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)/mezclas de DOPE (Pinnaduwage et al, (1989) Biochim. Biophys. Acta 985,33-37), diéster lipofilico de ácido glutamico (TMAG) con DOPE, CTAB, DEBDA, bromuro de didodecilamonio (DDAB), y estearilamina en mezcla con fosfatidiletanolamina (Rose et al., (1991) Biotechnique 10,520-525), DDAB/DOPE (TransfectACE, GIBCO BRL), y lípidos que llevan oligogalactosa. Agentes mejoradores de transfección ilustrativos que incrementan la eficiencia de la transferencia incluyen, por ejemplo, DEAE-dextran, polibreno, péptido disruptivo por lisosoma (Ohmori N I et al, Biochem Biophys Res Commun Jun. 27,1997; 235 (3): 726-9), proteoglicanos con base en condroitan, proteoglicanos

sulfatados, polietilenimina, polilisina (Pollard H et al. J Biol Chem, 1998 273 (13): 7507-11), péptido ligado por integrina CYGGRGDTP, no sacárido de dextran lineal, glicerol, grupos de colesterilo trabados en el enlace internucleosido en el terminal 3' de un oligonucleotido (Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86: (17):6553-6), lisofosfatida, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidietanolamina, y 1-oleoil lisofosfatidilcolina.

En algunas situaciones puede ser deseable suministrar el ácido nucleico con un agente que dirige el vector que contiene el ácido nucleico a las células objetivo. Tales moléculas "de objetivo" incluyen anticuerpos específicos para una proteína de membrana de superficie celular sobre la célula objetivo o un ligando para un receptor sobre la célula objetivo cuando se emplean liposomas, las proteínas que ligan a una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis pueden ser usadas para objetivar y/o facilitar la toma. Ejemplos de tales proteínas incluyen las proteínas de cápsidos y fragmentos de ellos trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que se someten a internalización en ciclado, y proteínas que objetivan localizaciones intracelulares y mejoran la vida por medio intracelular. En otras modalidades, la endocitosis mediada por receptor puede ser usada. Tales métodos son descritos, por ejemplo, en Wu et al., 1987 o Wagner et al., 1990. Para revisión del marcado de genes actualmente conocido y protocolos de terapia de genes, Ver Anderson 1992. Ver

321

también WO 93/25673 y las referencias citadas allí. Para las revisiones adicionales de la tecnología de terapia de genes, ver Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); y Miller, Nature, 357: 455460 (1992).

Métodos para Selección

Los terapéuticos efectivos dependen de la identificación eficaz de agentes que no tengan toxicidad significativa. Los anticuerpos pueden ser seleccionados en cuanto a su afinidad para ligado por los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ensayos de cambio de gel, Western blots, ensayo de competecion radiomarcada, co-fraccionación por cromatografía, co-precipitación, reticulado, ELISA, y similares pueden ser usados, los cuales están descritos en, por ejemplo, protocolos actuales en biología molecular (1999) John Wiley & Sons, NY, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Para tamizar inicialmente anticuerpos que ligan al epítopo deseado en M-CSF (por ejemplo, aquellos que ligan en bloque de RX1, 5H4, MC1 y/o MC3 a M-CSF), un ensayo de rutina de bloqueo cruzado tal como la que se describió en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), puede llevarse a

322

cabo. Los ensayos de ligado competitivo de rutina pueden también ser usados, en los cuales el anticuerpo desconocido es caracterizado por su habilidad para inhibir el ligado de M-CSF a un anticuerpo especifico de M-CSF de la invención. El M-CSF intacto, fragmentos de el o epítopos lineales tales como los representados por los aminoácidos 98-105 de M-CSF de la Figura 12, o los aminoácidos 65-73 o 138-144 de la Figura 12 (correspondientes a epítopos M-CSF reconocidos por 5H4 o MC3), pueden ser usados. El mapeo de epítopos es descrito en Champe et al. , J. Biol. Chem. 270: 1388-1394 (1995).

Se ha contemplado adicionalmente que los anticuerpos son ensayados a continuación en cuanto a sus efectos sobre la osteoclastogénesis, seguido por la administración a animales. Los compuestos potencialmente útiles en prevenir o tratar la pérdida del hueso asociada con metástasis de cáncer puede ser tamizada usando diversos ensayos. Por ejemplo, un antagonista candidato puede primero ser caracterizado en un sistema de células cultivadas para determinar su habilidad para neutralizar M-CSF en la inducción de osteoclastogénesis. Tal sistema puede incluir el co-cultivo de osteoblastos calvarios de ratón y células del bazo (Suda et al., Modulation of osteoclast differentiation. Endocr. Rev. 13: 66 80, 1992; Martin e Udagawa, Trends Endocrinol. Metab. 9: 6-12,1998), el co-cultivo de líneas celulares estromales de ratón (p. e., MC3T3-G2/PA6 y ST2) y células de bazo de ratón (Udagawa et al., Endocrinology 125: 1805 13,1989), y el co-cultivo de

323

células ST2 y células de la medula del hueso, células mononucleares de sangre periférica o macrófagos alveolares (Udagawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7260 4,1990; Sasaki et al., Cancer Res. 58: 462 7,1998; Mancino et al., J. Surg. Res. 100: 18-24,2001). En la ausencia de cualquier antagonista de M-CSF, células multinucleadas formadas en tales cultivos satisfacen el criterio principal de osteoclastos tal como ácido fosfatasa resistente a tartrato (TRAP, una enzima marcadora de osteoclastos) en cuanto a su actividad, receptores de calcitonina, p60C-STC, receptores de vitronectina, y la habilidad para formar huecos de resorción sobre el hueso y rajaduras en la dentina. La presencia de un antagonista efectivo de M-CFS inhibe la formación de tales células multinucleadas.

En adición a los anteriores sistemas de co-cultivo, la habilidad de un candidato anticuerpo para M-CSF en inhibir la osteoclastogénesis puede ser ensayada en un sistema estromal libre de célula o libre de osteoblastos. El M-CSF requerido para la osteoclastogénesis puede ser suministrado por células de cáncer metastásico co-cultivada (por ejemplo, MDA 231) o un medio condicionado para estas células cancerosas (Mancino et al., J. Surg. Res. 0: 18-24, 2001) o por la adición de M-CSF purificado.

La eficacia de un anticuerpo M-CSF dado en prevenir o tratar la pérdida de hueso asociada con la metástasis de

cáncer puede también ser ensayada en cualesquier sistemas de modelos de metástasis hueso animal familiar para aquellos versados en la técnica. Tales sistemas de modelo incluyen aquellos que involucran la inyección directa de células tumorales en la cavidad medular de los huesos (Ingall, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117: 819-22, 1964; Falasko, Clin. Orthop. 169: 20 7, 1982), en la aorta abdominal de rata (Powels et al., Br. J. Cáncer 28:316 21, 1973), en la vena lateral de la cola del ratón o en el ventrículo izquierdo de ratón (Auguello et al., Cáncer Res. 48: 6876 81, 1988). En la ausencia de un antagonista de M-CSF efectivo, las metástasis de hueso osteolíticas formadas de células tumorales inyectadas puede ser determinado por radiografías (área de las lesiones hueso osteolíticas) o histología e inmunohistoquímica (hueso y tejidos suaves). Sasaki et al., Cáncer Res. 55: 3551 7, 1995; Yoneda et al., J. Clin. Invest. 99:2509 17, 1997. Clohisy y Ramnaraime, Orthop Res. 16:600 6, 1998. Yin et al., J. Clin. Invest. 103:1097 206, 1999 en la presencia de un anticuerpo de M-CSF efectivo, la metástasis del hueso osteolítico puede ser prevenida, o inhibida para reforzar en metástasis más pequeñas o menores.

Los anticuerpos de M-CSF de la presente invención pueden también ser útiles para prevenir y tratar la metástasis de cáncer. La efectividad de un anticuerpo de M-CSF candidato en prevenir o tratar la metástasis de cáncer puede ser tamizada usando un modelo de invasión de membrana de base amniótica

325

humana como se describió en Filderman et al., Cáncer Res. 52:36616, 1992. Adicionalmente, cualquiera de los sistemas de modelo animal para metástasis de diversos tipos de cánceres pueden también ser usados. Tales sistemas de modelo incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Wenger et al., Clin. Exp. Metástasis 19: 169 73, 2002; Yi et al., Cáncer Res. 62:917 223, 2002; Tsutsumi et al., Cáncer Lett 169: 77-85, 2001; Tsingotjidou et al, Anticáncer Res. 21: 971 8,2001; Wakabayashi et al., Oncology 59: 75 80, 2000; Culp y Kogerman, Front Biosci. 3:D672 83, 1998; Runge et al., Invest Radiol. 32: 212 7; Shioda et al., J. Surg. Oncol. 64: 122 6, 1997; Ma et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 37: 2293 301, 1996; Kuruppu et al., J Gastroenterol Hepatol. 11: 26 32, 1996. En la presencia de un anticuerpo de M-CSF efectivo, la metástasis de cáncer puede ser prevenida, o inhibida para resultar en metástasis menores y/o más pequeñas.

La actividad antitumoral de un anticuerpo de M-CSF particular, o combinación de anticuerpo M-CSF, puede ser evaluada *in vivo* usando un modelo animal adecuado. Por ejemplo, modelos de cáncer de linfoma xenogénico en donde las células de linfoma humanas son introducidas en animales inmucomprometidos, tales como ratones desnudos o SCID. La eficacia puede ser predicho usando ensayos que miden la inhibición de la formación del tumor, la regresión o metástasis del tumor, y similares.

326

En una variación de un ensayo *in vitro*, la invención suministra un método que comprende la etapas de (a) poner en contacto un M-CSF inmovilizado con un anticuerpo candidato y (b) detectar el ligado del anticuerpo candidato al M-CSF. En una modalidad alternativa, el anticuerpo candidato es inmovilizado y el ligado del M-CSF es detectado. La inmovilización es llevada a cabo usando cualesquiera de los métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo enlace covalente a un soporte, un granulo o una resina cromatográfica, lo mismo que no covalente, o interacción de alta afinidad tal como ligado de anticuerpo o uso de ligado por estreptavidina/biotina en donde el compuesto inmovilizado incluye una parte de biotina. La detección del ligado puede llevarse acabo (i) usando una marca radioactiva sobre el compuesto que no está inmovilizado, (ii) usando una marca fluorescente sobre el compuesto no inmovilizado, (iii) usando un anticuerpo inmunoespecífico para el compuesto no inmovilizado, (iv) usando una marca sobre el compuesto no inmovilizado que excite un soporte fluorescente al cual el compuesto inmovilizado está sujeto, lo mismo que otras técnicas bien conocidas y practicadas rutinariamente en la técnica.

Los anticuerpos que modulan (es decir, incrementan, disminuyen, o bloquean) la actividad o expresión del M-CSF pueden ser identificados por medio de incubar un modulador putativo con una célula que expresa un M-CSF y determinar el

327

efecto del modulador putativo sobre la actividad o expresión del M-CSF. La selectividad de un anticuerpo que modula la actividad de un polipéptido o polinucleótido M-CSF puede ser evaluado por medio de compara sus efectos sobre el polipéptido o el polinucleótido M-CSF con respecto a sus efectos sobre otros compuestos relacionados. Los moduladores selectivos pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos y tras proteínas, péptidos, o moléculas orgánicas que ligan específicamente a los polipéptidos M-CSF o a un ácido nucleico que codifica un péptido M-CSF. Los moduladores de la actividad del M-CSF serán útiles terapéuticamente en el tratamiento de enfermedades y condiciones fisiológicas en que la actividad normal o aberrante del polipéptido M-CSF se ha involucrado.

La invención también incluye ensayos de tamizado de alto rendimiento (HTS) para identificar anticuerpos que interactúan o inhiben actividad biológica (es decir, inhiben la actividad enzimática, la actividad de ligado, etc.) de un polipéptido M-CSF. Los ensayos HTS permiten el tamizado de un gran número de compuestos en una manera muy eficiente. Los sistemas HTS con base en células son contemplados para investigar la interacción entre los polipéptidos M-CSF y sus socios de ligado. Los ensayos HTS son designados para identificar "golpes" o "compuestos líderes" que tiene la propiedad deseada, de cuyas modificaciones pueden diseñarse para mejorar las propiedades deseadas. La modificación

328

química del "golpe" o "compuesto líder" frecuentemente está basada en una relación identificable de estructura/ actividad entre el "golpe" y los polipéptidos M-CSF.

Otro aspecto de la presente invención está dirigida a métodos para identificar anticuerpos que modulan (por ejemplo, disminuyes) la actividad de un M-CSF que comprende poner en contacto un M-CSF con un anticuerpo, y determinar si el anticuerpo modifica la actividad del M-CSF. La actividad en la presencia del anticuerpo de ensayo es comparada a la actividad en la ausencia del anticuerpo de ensayo. Donde la actividad de la muestra que contiene el anticuerpo de ensayo sea menor que la actividad en la muestra que carece del anticuerpo de ensayo, el anticuerpo tendrá actividad inhibida.

Una variedad de sistemas heterólogos está disponible para la expresión funcional de polipéptidos recombinantes que son bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Tales sistemas incluyen bacterias (Strosberg, et al., Trends in Pharmacological Sciences (1992) 13: 95-98), levadura (Pausch, Trends in Biotechnology (1997) 15: 487-494), diversas clases de células de insectos (Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology (1996) 164: 189-268), células de anfibios (Jayawickreme et al., Current Opinion in Biotechnology (1997) 8: 629-634) y diversas líneas de células de mamíferos (CHO, HEK293, COS, etc; ver Gerhardt, et al., Eur. J. Pharmacology (1997) 334:1-

329

23). Estos ejemplos no precluyen el uso de otros posibles sistemas de expresión celular, incluyendo líneas de células obtenidas de nematodos (Solicitud PCT WO 98/37177).

En una modalidad de la invención, los métodos de tamizado para anticuerpos que modulan la actividad del M-CSF comprende poner en contacto anticuerpos de ensayo con un polipéptido M-CSF y ensayar en cuanto a la presencia de un complejo entre el anticuerpo y el M-CSF. En tales ensayos, el ligando es típicamente marcado. Después de incubación adecuada, el ligando libre es separado de aquello presente en forma ligada, y la cantidad de marca libre o no complejada es una medida de la habilidad del anticuerpo particular para ligarse al M-CSF o M-CSFR.

En otra modalidad de la invención, un tamizado de alto rendimiento para fragmentos de anticuerpo o CDRs tiene afinidad de ligado adecuada a un polipéptido M-CSF es empleado. Brevemente, grandes números de diferentes compuestos de ensayo de péptidos pequeños son sintetizados sobre un sustrato sólido. Los anticuerpos de ensayo de péptidos están en contacto con un polipéptido M-CSF y son lavados. Los polipéptidos M-CSF ligados son entonces detectados por métodos bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos purificados de la invención también pueden estar recubiertos directamente sobre placas para uso en las técnicas de tamizado de drogas anteriormente mencionadas. En

330

adición, anticuerpos no neutralizantes pueden ser usados para capturar la proteína e inmovilizarla sobre el soporte sólido.

Terapia de Combinación

Habiendo identificado más de un anticuerpo M-CSF que es efectivo en un modelo animal, puede ser adicionalmente ventajoso mezclar dos o más de tales anticuerpos M-CSF juntos para suministrar todavía una eficacia mejorada contra la metástasis de cáncer y/o la pérdida de hueso asociada con la metástasis de cáncer. Las composiciones comprenden uno o más anticuerpo N-CSF pueden ser administradas a perdonas o mamíferos que sufren de, o están predispuestos a sufrir de metástasis de cáncer y/o pérdida de hueso asociada con la metástasis del cáncer. La administración concurrente de dos agentes terapéuticos no requiere que los agentes sean administrados al mismo tiempo o por la misma ruta, siempre que exista un sobreposicionamiento en el periodo de tiempo durante el cual los agentes ejercen su efecto terapéutico. Las administraciones simultáneas o secuenciales se contemplan como la administración durante diferentes días o semanas.

Aunque la terapia con anticuerpo M-CSF puede ser útil para todas las etapas de cáncer, la terapia de anticuerpo puede ser apropiada en cánceres avanzados o metastásicos. Combinar el método de terapia con anticuerpo con un régimen quimioterapéutico o de radiación puede ser

preferido en pacientes que no hayan recibido tratamiento quimioterapéutico, mientras que el tratamiento con terapia de anticuerpos puede ser el indicado para pacientes que hayan recibido una o más quimioterapias. Adicionalmente, la terapia con anticuerpo puede también permitir el uso de dosificaciones reducidas de quimioterapia concomitante, particularmente en pacientes que no toleran la toxicidad del agente quimioterapéutico muy bien.

El método de la invención contempla la administración de anticuerpos anti-M-CSF únicos, lo mismo que combinaciones, o "cócteles" de diferentes anticuerpos. Tales cócteles de anticuerpo pueden tener ciertas ventajas siempre que ellos contengan anticuerpos que exploten diferentes mecanismos efectores o combinen anticuerpos citotóxico directamente con anticuerpos que descansan en la funcionalidad efectora inmune. Tales anticuerpos en combinación pueden exhibir efectos terapéuticos sinergísticos.

Combinar RX1 o derivado Human Engineered™ de RX1 anticuerpo con otros terapéuticos puede tener un efecto sobre un paciente que experimenta enfermedad osteoclástica y/o crecimiento tumoral o metástasis. Por ejemplo, uno podría usar un anticuerpo RX1 en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente que tiene una enfermedad osteolítica en donde dicho medicamento está coordinado con tratamiento

332

usando un anticuerpo anti-RANKL, receptor soluble RANKL, otros inhibidores de RANKL, o bifosfonatos (por ejemplo Aredia; Zometa; Clodronato). Alternativamente, uno podría usar un anticuerpo anti-RANKL o bisfosfonato en la fabricación de medicamento para tratar un paciente que tenga una enfermedad osteolítica en donde dicho medicamento está coordinado con tratamiento usando anticuerpo RX1 o un derivado hecho por ingeniería genética humano de anticuerpo RX1. La combinación puede también tener un efecto sinergístico en un paciente tratado. El anticuerpo de RX1 u otro terapéutico no requiere ser administrado simultáneamente. RX1 o la variante humana hecha por ingeniería y el otro terapéutico pueden ser administrados en un día, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año o 2 años de diferencia uno del otro.

La invención también contempla el uso de un anticuerpo RX1 o un derivado humano de anticuerpo RX1 Human Engineered™ en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente que tenga una enfermedad osteolítica en donde dicho medicamento es usado en un paciente que ha sido pretratado con un anticuerpo anti-RANKL o bisfosfonatos. "Pretratamiento" significa que un paciente ha sido tratado en un plazo de 2 años, 1 año, 6 meses, 3 meses, 2 meses, 1 mes, 2 semanas, 1 semana o por lo menos un día antes del tratamiento con RX1 o la variante Human Engineered™ de RX1.

333

El anticuerpo RX1 o las variantes Human Engineered™ pueden ser usadas en combinación con otros terapéuticos para el cáncer. Por ejemplo, uno podría usar de anticuerpo RX1 o variante hechas por ingeniería genética humana en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente que tiene la enfermedad del cáncer en donde dicho medicamento esta coordinado con tratamiento usando otros agentes terapéuticos y/o procedimientos, incluyendo pero sin limitarse a varios agentes quimioterapéuticos, androgen-bloqueadores y moduladores e inmunomoduladores (por ejemplo IL-2, GM-CSF, SLC), bisfosfonatos (por ejemplo Aredia; Zometa; Clodronato), cirugía, radiación, quimioterapia citotóxica, terapia hormonal (por ejemplo Tamoxifen; terapia anti-andrógeno), terapia anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos para neutralizar RANKL/RANK; neutralizar PTHrP, anticuerpos anti-Her2, anti-CD20, anti-CD40, CD22, VEGF, IGFR-1, EphA2, HAAH, TMEFF2, CAIX), terapia de proteína terapéutica (por ejemplo receptor de RANKL soluble; inhibidores de OPG, y PDGF y MMP), terapia de drogas de moléculas pequeñas (por ejemplo, inhibidor de Src-quinaza), inhibidores de quinaza de receptores de factor de crecimiento, o inhibidores de RANKL, terapia de oligonucleótidos (por ejemplo RANKL o RANK o PTHrP antisentido), terapia de genes (por ejemplo, inhibidores de RANKL o RANK), terapia de péptidos (por ejemplo, muteinas de RANKL) lo mismo que aquellas proteínas, péptidos, compuestos, y moléculas pequeñas descritas aquí.

El RX1 y las variante Human Engineered™ pueden ser usadas en la fabricación de un medicamento para tratar pacientes que han sido pretratados con los terapéuticos mencionados anteriormente.

Un agente citotóxico se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de células. El termino tiene el propósito de incluir isótopos radiactivos (por ejemplo I^{131}, I^{125},Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fungal, de plantas o animales o toxinas sintéticas , o fragmentos de ellas. Un agente no citotóxico se refiere a una sustancia que no inhibe ni impide la función de las células y/o no causa la destrucción de las células. Un agente no citotóxico puede incluir a un agente que pueda ser activado para ser citotóxico. Un agente no citotóxico puede incluir un granulo, liposoma, matriz o partícula (ver, por ejemplo, publicaciones de patentes estadounidense 2003/0028071 y 2003/0032995 que son incorporadas como referencia aquí). Tales agentes pueden ser conjugados, acoplados, enlazados o asociados con un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Los agentes quimioterapéuticos para el cáncer incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, tales como carboplatina y cisplatina; agentes alquilantes de mostaza de nitrógeno; agentes alquilantes de nitrosourea, tales como carmustina

335

(BCNU); antimetabolitos, tales como metotraxato; ácido folínico; antimetabolitos análogos de purina, mercaptopurina; antimetabolitos análogos de pirimidina, tales como fluorourazil (5-FU) y gencitabina (Gemzar®); antineoplásticos hormonales, tal como goserelina, leutrolida y tamoxifen; antineoplásticos naturales, tales como aldesleucina, interleucina-2, docetaxel, etoposida (VP-16), interferon alfa, paclitaxel (Taxol®), y tretinoina (ATRA); antineoplásticos naturales antibióticos, tales como bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina daunomicina y mitomicinas incluyendo la mitomicina C; y antineoplásticos naturales alcaloides vinca, tales como vinblastina, vincristina, vindesina; hidroxiurea; aceglaton, adriamicina, idosdamida, enocitabina, epitiostanol, aclarubicina, ancirabina, nimustina, hidrocloruro de procarbaxina, carbucona, carboplatina, carmofur, cromomicina A3, polisacáridos antitumor, factores de plaquetas antitumor, ciclofosfamida (Cytoxin®), Schizophyllan, citarabina (citosina arabinosida), dacarbasina, tioinosina, tiotepa, tegafur, dolastatinas, análogos de dolastatina tales como auristatina, CPT-11 (irinotecan), mitozantron, vinorelbina, teniposida, aminoperina, carminomicina, esperamicinas (ver, por ejemplo, patente estadounidense No. 4,675,187), neocarcinostatina, OK-432, bleomicina, furtulon, broxuridina, busulfan, honvan, peplomicina, bestatina (Ubenimex®), interferon-β, mepitiostano, mitobrotinol, melfalan, péptidos

336

de laminina, lentinan, extracto versicolor Coriolus, tegafur/uracilo, estramustina (estrógeno/mecloretamina).

Adicionalmente, agentes adicionales usados como terapia para pacientes con cáncer incluye EPO, G-CSF, ganciclovir; antibióticos, leuprolida; meperidina; zidovudina (AZT); interleucina 1 a 18 incluyendo mutantes y análogos; interferones o citosinas, tales como interferones α, β, y hormonas γ, tales como la hormona luteinizante de liberación de hormona (LHRH) y análogos y, gonadotropina de liberación de hormona (GnRH); factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento β transformante (TGF-β), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de liberación de hormona de crecimiento (GHRF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos factor homologo (FGFHF), y factor de crecimiento de insulina (IGF); los factores α y β de necrosis tumoral (TNF-α & β); factor-2- de inhibición de invasión (IIF-2); proteínas 1-7 morfogenéticas del hueso (BMP1-7); somatostatina; timosina-α-1; γ-globulina; dimutasa superóxido (SOD); factores de complemento; factores anti-angiogénesis; material antigénico; y prodrogas.

Prodroga se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica o no citotóxica para células tumorales comparado

337

la droga pariente y es capaz de ser activada enzimáticamente o convertida en un pariente activo o el pariente más activo. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed), pp. 247-267, Humana Press (1985). Las prodrogas incluyen, pero no se limitan a prodrogas que contiene fosfato, prodrogas que contienen tiofosfato, prodrogas que contienen sulfato, prodrogas que contienen péptido, prodrogas modificadas por aminoácido D, prodrogas glicociladas, prodrogas que contienen β-lactam, opcionalmente sustituidas con prodrogas que contienen fenoxiacetamida u opcionalmente sustituidas con prodrogas que contienen fenilacetamida, prodrogas 5-fluorocitocina u otra 5-fluorouridina que pueden ser convertidas en drogas citotóxicas libres más activas. Ejemplos de drogas citotóxicas que pueden ser derivadas en una forma de prodroga para uso aquí incluyen, pero no se limita, a aquellos agentes quimiterapéuticos descritos anteriormente.

Administración y Preparación

Los anticuerpos anti-M-CSF usados en la práctica de un método de la invención pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el método de suministro deseado. Los vehículos adecuados

338

incluyen cualquier material que, cuando se combinan con los anticuerpos anti-M-CSF, retienen la función antitumor del anticuerpo y no reaccionan con los sistemas inmunes del sujeto. Ejemplos incluyen pero no se limitan a, cualquiera de un número de vehículos farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas amortiguadas con fosfato estériles, agua bacteriostática, y similares. Una variedad de vehículos acuosos pueden ser usados, por ejemplo, agua, agua amortiguada, salina al 0.4%, glicina al 0.3% y similares, y puede incluir otras proteínas para estabilidad mejorada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc., sometidas a modificaciones químicas suaves o similares.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo son preparadas para el almacenamiento por medio de mezclar el anticuerpo que tiene un grado deseado de pureza con vehículos opcionales fisiológicamente aceptables, excipientes o estabilizadores (Temington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos aceptables, excipientes o estabilizadores don no tóxicos para los receptores en dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluye amortiguadores tales como fosfato, citrato, u otros ácidos orgánicos; los antioxidantes incluyen ácido ascórbico y metionina; los preservativos (tales como cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol fenol,

331

butil o benzilo; alquil parabens tales como paraben metilo o propilo; catecol; resorsinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de cerca de 10 residuos); proteínas, tales como suero de albúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azucares tales sacarosa, manitol, trealoza o sobitol; iones contadores formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación aquí puede también contener más de un compuesto activo según sea necesaria para la indicación particular que esta siendo tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente unos a otros. Por ejemplo, puede ser deseable suministrar un agente inmunosupresivo. Tales moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito propuesto.

Los ingredientes activos también pueden estar entrampados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial,

340

por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacilato) respectivamente en sistemas de suministro de drogas coloidales (por ejemplo, liposomas, microesféras de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nano-cápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas están descritas en la Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a ser usadas para administración in vivo deben ser estériles. Esto es logrado fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Un anticuerpo es administrado por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o subcutánea. En adición, el anticuerpo es administrado adecuadamente por infusión de pulso, particularmente con dosis que declinan del anticuerpo. Preferiblemente la dosificación esta dada por inyecciones, más preferiblemente intravenosa o inyecciones subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Otros métodos de administración están contemplados, incluyendo tópica, particularmente transdérmica, transmucosal, rectal, oral o

341

administración local por ejemplo a través de un cateto colocado cerca al sitio deseado.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en la forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, tabletas, cápsulas supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las composiciones presentes pueden ser formuladas por varias rutas de administración, por ejemplo, por administración oral, por administración nasal, por administración rectal, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyecciones intramusculares, o inyección intraperitoneal. Las siguientes formas de dosificación están dadas como vía de ejemplo y no deben ser tomadas como limitativas de la presente invención.

Para administración oral, bucal y sublingual, polvos, suspensiones, gránulos, tabletas, píldoras, cápsulas, cápsulas de gelatina, tabletas son aceptables como formas de dosificación sólida. Están pueden ser preparadas, por ejemplo, mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales farmacéuticamente aceptables o tautómeros de ella, con por lo menos un aditivo tal como almidón u otro aditivo. Los aditivos adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, mantitol, dextran, almidón, agar, alginatos, citinas citosans, pectinas, goma de tragacanto, goma arábica, gelatinas, colágenos, cafeína, albúmina, polímeros sintéticos o semi-sintéticos o glicéridos.

342

Opcionalmente las formas de dosificación oral pueden contener otros ingredientes para ayudar en la administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como estearato de magnesio o preservativos tales como paraben o ácido sórbico, o antioxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente desintegrante, aglomerantes, espesantes, amortiguadores endulzantes, agentes saborizantes o agentes de perfume. Las tabletas y oidoras pueden adicionalmente estar tratadas con materiales de recubrimiento adecuados conocidos en la técnica.

Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden estar en la forma de emulsiones, jarabes, elixires, suspensiones, y soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener un diluyente inactivo, tal como agua. Las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden estar preparados como suspensiones o soluciones liquidas usando un líquido estéril, tal como, pero sin limitarse a, un aceite, agua, un alcohol, y combinaciones de estos. Los tensoactivos, agentes de suspensión, agentes emulsificantes farmacéuticamente adecuados pueden ser agregados para la administración oral o parenteral.

Como se anotó anteriormente, las suspensiones pueden incluir aceites, tal como incluir aceite, pero no limitarse a aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz y aceite de oliva. Las preparaciones

343

343

en suspensión pueden también contener esteres de ácidos grasos tales como etil oleato, meristato de isopropilo, glicéridos de ácidos graos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones de suspensión pueden incluir alcoholes, tales como pero sin limitarse a etanol, alcohol isopropilo, alcohol hexadecilo, glicerol y propilen glicol. Éteres, tales como pero sin limitarse a, poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo tales como aceite mineral y petrolato; agua y agua también puede ser usada en formulaciones de suspensión.

Para la administración nasal, las formulaciones farmacéuticas y los medicamentos deben ser un rociado o aerosol que contenga un disolvente apropiado y opcionalmente otros compuestos tales como, pero sin limitarse a estabilizadores, agentes antimicrobiales, antioxidantes, modificadores de pH, tensoactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos. Un propelante para una formulación de aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono o un hidrocarburo basado en un disolvente de baja ebullición.

Las formas de dosificación inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones de aceite que pueden ser preparadas usando un dispersante o un agente humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en fase de solución o en la forma de

344

una suspensión, que es preparada con un disolvente o un diluyente. Los disolventes aceptables son vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer, o una solución salina acuosa isotónica. Alternativamente, los aceites estériles pueden ser empleados como disolventes o agentes de suspensión. Preferiblemente, el aceite o el ácido graso es no volátil, incluyendo aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono-, di- o tri-glicéridos.

Para inyección, la formulación y/o medicamento farmacéutico puede ser un polvo adecuado para su reconstitución con una solución apropiada como se describió anteriormente. Ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, polvos secados por congelamiento, secados por rotación o secados por rociado, polvos amorfos, gránulos, precipitados o particulados. Para la inyección, las formulaciones pueden opcionalmente contener estabilizadores, modificadores de pH, tensoactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos.

Para administración rectal, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden estar en la forma de un supositorio, un ungüento, un enema, una tableta o una crema para liberación del compuesto en los intestinos, en el plexo sigmoide y/o en le recto. Laos supositorios rectales con preparados por medio de mezclar uno o más compuestos de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o

345

tautómeros del compuesto, con vehículos aceptables, por ejemplo, mantequilla de cocoa o polietilenglicol, que esta presente en una fase sólida a temperaturas de almacenamiento normales, y presente en una fase liquida en aquellas temperaturas adecuadas para la liberación de una droga al interior del cuerpo, tal como en el recto. Los aceites pueden también ser empleados en la preparación de formulaciones del tipo gelatina suave y supositorios. Agua, salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y gliceroles pueden ser empleados en la preparación de formulaciones de suspensión que pueden también contener agentes de suspensión, tales como pectinas, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o carboximetilcelulosa, lo mismo que amortiguadores y preservativos.

Las preparaciones de liberación suspendida pueden ser preparadas. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli (vinilalcohol)), polilácticos (Patente Estadounidense No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradables, ácido láctico-ácido glicólico como copolímeros degradables tales

346
346

como el Lupron Depot™ (microésferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante cerca de 100 días ciertos hidrogeles liberan proteínas durante tiempos de periodo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, ellos pueden desnaturalizarse o agregarse como un resultado de la exposición a la humedad a 37°C., resultando en una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en inmunogenicidad. Estrategias racionales pueden visualizarse para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado por ejemplo, si el mecanismo de agregación es descubierto como una formación de enlace intermolecular S-S a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede ser lograda por medio de modificar residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones acídicas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz de polímero especificas.

Las formulaciones de la invención pueden ser diseñadas para actuación corta, liberación rápida, actuación larga, o liberación sostenida como se describe aquí. Así, las formulaciones farmacéuticas también pueden ser formuladas para liberación controlada o para liberación lenta.

347

Las composiciones presentes, también pueden comprender, por ejemplo, micelas o liposomas, y alguna otra forma encapsulada o pueden ser administradas en una forma de liberación extendida para suministrar un almacenamiento prolongado y/o efecto de suministro. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden ser comprimidos en pepas o cilindros e implantados intramuscular o subcutáneamente como inyecciones de depósito o como implantes tales como stents. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

A parte de aquellas formas de dosificación representativas descritas anteriormente, los excipientes farmacéuticamente aceptables y vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos generalmente por aquellos basados en la técnica y son por lo tanto incluidos en la presente invención. Tales excipientes y vehículos han sido descritos, por ejemplo en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991), que se incorpora aquí como referencia.

Dosificaciones específicas pueden ser ajustadas dependiendo de las condiciones de la enfermedad, la edad, el peso del cuerpo, las condiciones generales de salud, sexo, y dieta del sujeto, intervalos de dosis, rutas de

348

administración, velocidad de la excreción, y combinaciones de drogas. Cualquiera de las anteriores formas de dosificación que contienen cantidades efectivas están bien dentro de los límites de la experimentación de rutina y por lo tanto, caben dentro del alcance de la presente invención.

Los anticuerpos de M-CSF útiles como terapéuticos para la metástasis del cáncer o la pérdida de hueso asociada con la metástasis de cáncer frecuentemente se prepararan sustancialmente libres de otras inmunoglobulinas de ocurrencia natural u otras moléculas biológicas. Los anticuerpos de M-CSF preferidos exhibirán también toxicidad mínima cuando son administrados a un mamífero afligido con, o predispuesto a sufrir de, metástasis de cáncer y/o pérdida de hueso asociada con la metástasis de cáncer.

Las composiciones de la invención pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones resultantes pueden ser empacadas para uso o filtradas bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada es combinada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según lo requerido para condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes de ajuste de pH y amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio,

cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y estabilizadores (por ejemplo, 1 20% de maltosa).

Los anticuerpos de M-CSF de la presente invención pueden también ser administrados por vía de liposomas, que son vesículas pequeñas compuestas de diversos tipos de lípidos y/o fosfolípidos y/o tensoactivos que son útiles para el suministro de una droga (tal como los anticuerpos descritos aquí y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico). Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, dispersiones de fosfolípidos, capas lamelares y similares, y pueden servir como vehículos para objetivar los anticuerpos del M-CSF a un tejido particular lo mismo que incrementar la vida media de la composición. Una variedad de métodos están disponibles para preparar liposomas, como se describió en, por ejemplo las Patentes Estadounidenses Nos. 4,837,028 y 5,019,369, dichas patentes son incorporadas aquí como referencia.

Los liposomas que contienen el anticuerpo son preparados por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); y las Patentes Estadounidenses Nos. 4,485,045 y 4,544, 545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorados se han descrito en la Patente Estadounidense No. 5,013, 556. Los liposomas particularmente útiles pueden ser generados por

370

método de evaporación de fase inversa con una composición de lípido que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas son extruidos a través de filtros de tamaño de poro definidos PATRA proporcionar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden ser conjugados con los liposomas según se describió en Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) por vía de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) es contenido opcionalmente dentro de la liposoma [Ver, p. e., Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19): 1484 (1989)].

La concentración del anticuerpo de M-CSF en estas composiciones puede variar ampliamente, es decir, desde menos de cerca de 10% usualmente a por lo menos cerca de 25% y tanto como 75% o 90% en peso y serán seleccionados principalmente por volúmenes fluidos, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables oral, tópica y parenteralmente serán conocidos o evidentes para aquellos versados en la técnicas y son descritos en detalle en, por ejemplo, la Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995), que se incorpora aquí como referencia.

351

La determinación de una cantidad efectiva de una composición de la invención para tratar la metástasis del cáncer y/o la pérdida de hueso asociada con la metástasis de cáncer en un paciente puede ser llevada a cabo a través de métodos empíricos estándar que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad neutralizante in vivo del suero de un sujeto tratado con una dosificación edad de anticuerpo de M-CFS puede ser evaluada usando un ensayo que determine la habilidad del suero para bloquear la proliferación y supervivencia inducida de M-CSF de los monocitos de murino (CD11b + células, un subconjunto de la célula CD11, que expresa altos niveles del receptor para M-CSF) in vitro como se describió en Cenci et al., J Clin. Invest. 1055: 1279-87,2000.

Las composiciones de la invención son administradas a un mamífero que ya sufre de, o esta predispuesto a, metástasis de cáncer y/o pérdida de hueso asociada con la metástasis de cáncer en una cantidad suficiente para impedir o por lo menos detener parcialmente el desarrollo de la metástasis de cáncer y/o la pérdida de hueso asociada con la metástasis de cáncer. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto es definida en una "dosis terapéuticamente efectiva". Cantidades efectivas de un anticuerpo de M-CSF variarán y dependerán de la severidad de la enfermedad y el peso y el estado general del paciente a ser tratado, pero generalmente esta dentro del rango de cerca de 1.0 µg/kg a cerca de 100 mg/kg de peso del

352

cuerpo, o cerca de 10 µg/kg a cerca de 30 mg/kg, con dosificaciones desde cerca de 0.1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg y alrededor de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg por aplicación siendo la más comúnmente usada. Por ejemplo, cerca de 10 µg/kg a 5 mg/kg o cerca de 30 µg/kg a 1 mg/kg de anticuerpo es una dosificación candidato inicial para la administración al paciente, si, por ejemplo, se hace por una o más administraciones separadas, o por infusión continúa. La administración es diaria, sobre días alternativos, semanalmente o menos frecuentemente, según sea necesario dependiendo de la respuesta a la enfermedad y de la tolerancia del paciente a la terapia. Las dosificaciones de mantenimiento durante periodos más largos de tiempo tales como 4, 5, 6, 7, 8, 10 o 12 semanas o más pueden ser necesarias hasta que una supresión necesaria de los síntomas de la enfermedad ocurra, y las dosificaciones pueden ser ajustadas como sea necesario. El progreso de esta terapia es monitoreado fácilmente por técnicas convencionales y ensayos convencionales.

Las administraciones únicas o múltiples de la composición pueden ser llevadas a cabo con niveles de dosis y patrones seleccionados por el medico tratante. Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, como se definió anteriormente, la severidad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo es administrado para

propósitos preventivos o terapéuticos, terapias anteriores, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción de médico que atiende. El anticuerpo es administrado adecuadamente al paciente de una sola vez o en una serie de tratamientos.

En cualquier evento, las formulaciones deberían suministrar una cantidad de anticuerpo de M-CSF durante el tiempo que sea suficiente para prevenir efectivamente o minimizar la severidad de la metástasis del cáncer y/o la pérdida de hueso asociada con metástasis de cáncer. Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas solas o como una terapia adjunta en conjunto con otros terapéuticos conocidos en la técnica para el tratamiento de la metástasis del cáncer y/o la pérdida de hueso asociada con la metástasis de cáncer.

La composición del anticuerpo será formulada, dosificada y administrada de una manera consistente con una buena práctica medica. Factores para consideración en este contexto incluyen el desorden particular a ser tratado, el mamífero particular que va a ser tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del desorden, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos para los practicantes médicos. La cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo a ser administrada será gobernada por

354

tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para impedir, mejorar o tratar la enfermedad mediada por M-CSF, condición o desorden, particularmente para tratar células de cáncer y más particularmente para tratar metástasis de células de tumor. Tal cantidad esta preferiblemente por debajo de la cantidad que es tóxica al huésped o convierte al huésped significativamente más susceptible a infecciones.

El anticuerpo no requiere ser, pero es opcionalmente formulado con uno o más agentes usualmente usados para prevenir o tratar el desorden en cuestión. Por ejemplo, en cáncer, el anticuerpo puede ser dado en conjunto con un agente quimioterapéutico o un ADEPT como se describió anteriormente. La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad del anticuerpo presente en la formulación, el tipo de enfermedad, la condición o desorden o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Estos son generalmente usados en las mismas dosificaciones y con las vías de administración como se han usado aquí antes de cerca de 1 a 99% de las dosificaciones empleadas aquí.

En otra modalidad de la invención, un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento de las enfermedades, desordenes o condiciones descritas anteriormente se suministra, incluyendo para el tratamiento del cáncer. El artículo de manufactura comprende un contenedor y un marcador. Los contenedores adecuados

355

incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas y tubos de ensayo. Los contenedores pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener una puerta de acceso estéril (por ejemplo el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo de la invención. La marca sobre, o asociada con, el contenedor indica que la composición es usada para tratar la condición de escogencia. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo contenedor que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como una salina amortiguada por fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Esta puede incluir adicionalmente otros materiales deseables de un punto de vista del comercial y de usuario, incluyendo otros amortiguadores diluyentes, filtros, agujas jeringas, e insertos de empaque con instrucciones para su uso.

Inmunoterapia

Anticuerpos anti-M-CSF útiles en el tratamiento de pacientes que tienen cáncer incluyen aquellos que son capaces de iniciar una respuesta inmune potente contra el tumor y aquellos que son capaces de dirigir la citotoxicidad. A esto respecto, los anticuerpos-M-CSF pueden producir la lisis de

356

la célula tumoral sea por mecanismos de citotoxicidad mediados por complemento o por células dependiente de anticuerpo (ADCC) ambos de los cuales requieren una porción Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para la interacción con los sitios de receptor Fc de la célula efectora o las proteínas complemento. En adición, los anticuerpos anti-M-CSF que ejercen un efecto biológico directo sobre el crecimiento del tumor son útiles en la práctica de la invención. Los mecanismos potenciales por los cuales tales anticuerpos directamente citotóxicos pueden actuar incluyen la inhibición del crecimiento celular, la modulación de la diferenciación celular, la modulación de los perfiles del factor de angiogénesis del tumor, y la inducción de la apoptosis. El mecanismo por el cual un anticuerpo anti-M-CSF particular ejerce un efecto anti-tumor puede ser evaluado usando cualquier número de ensayos *in vitro* diseñados para determinar ADCC, ADMMC, lisis de células mediadas por complemento, etc., y es generalmente conocido en la técnica.

En una modalidad, la inmunoterapia se lleva a cabo usando anticuerpos que tienen una mayor afinidad para la forma de ligado de membrana del M-CSF (M-CSFα) que para las formas secretadas de M-CSF. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser preparados de manera que ligan específicamente a o alrededor del sitio de ruptura del M-CSFα o a la porción adyacente del M-CSFα a la membrana. Tales anticuerpos pueden

también inhibir benéficamente la ruptura y liberación de la porción activa soluble del M-CSFα.

Los anticuerpos anti-M-CSF pueden ser administrados en sus formas "desnudas" o no conjugadas, o pueden tener agentes terapéuticos conjugados con ellos. En una modalidad, los anticuerpos anti-M-CSF son usados como un radio sensibilizador. En tales modalidades, los anticuerpos anti-M-CSF son conjugados a un agente radiosensible. El término "radiosensibilizador" como se usa aquí, es definido como una molécula, preferiblemente una molécula de bajo peso molecular, administrada a animales en cantidades terapéuticamente efectivas para incrementar la sensibilidad de las células a ser radiosensibles a la radiación electromagnética y/o para promover el tratamiento de enfermedades que son tratables con radiación electromagnética. Las enfermedades que son tratables con radiación electromagnética incluyen enfermedades neoplásicas, tumores benignos y malignos, y células cancerosas.

El término "radiación electromagnética" y "radiación" como se usa aquí incluye, pero no se limita a, radiación que tiene la longitud de onda de 10^{-20} a 100 metros. Modalidades preferidas de la presente invención emplean la radiación electromagnética de: radiación gamma (10^{-20} a 10^{-13} m), radiación con rayos-X (10^{-12} a 10^{-9} m), luz ultravioleta (10 nm

358

a 400nm), luz visible (400nm a 700nm), radiación infrarroja (700 nm a 1.0 mm), y radiación de microondas (1 mm a 30 cm).

Los radiosensibilizadores son conocidos en cuanto a que incrementan la sensibilidad de las células cancerosas a los efectos tóxicos de la radiación electromagnética. Muchos protocolos de tratamiento de cáncer actualmente emplean radiosensibilizadores activados por la radiación electromagnética de rayos-X. Ejemplos de radiosensibilizadores activados por rayos-X incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, mitomicina C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, nocotinamida, 5-bromodeoxiridina (BUdR), 5-iododeoxiuridina (IUdR), bromodeoxicitidina, fluorodeoxiuridina(FUdR), hidroxiurea, cisplatina, y análogos terapéuticamente efectivos y derivados de los mismos.

La terapia fotodinámica (PDT) de canceres emplea luz visible como el activador de radiación del agente sensibilizante. Ejemplos de radiosensibilizadores fotodinámicos incluyen los siguientes, pero no se limitan a: derivados de hematoporfirina, Fotofrin, benzoporfirina y derivados de ella, NPe6, etioporfirina de estaño (SnET2), feoborbida-a, bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianina de zinc, y análogos terapéuticamente efectivos y derivados de los mismos.

359

En otra modalidad, el anticuerpo puede ser conjugado a un receptor (tal como streptavidina) para la utilización en preobjetivado de tumores en donde el conjugado anticuerpo-receptor es administrado al cliente, seguido por la remoción del conjugado no ligado de la circulación usando un agente clarificante y entonces la administración de un ligando (p.e., avidina) que es conjugada a un agente citotóxico (p.e., un radionuclido).

La presente invención suministra adicionalmente los anticuerpos anteriormente descritos en forma marcada detectablemente. Los anticuerpo pueden ser marcados detectablemente por medio del uso de radioisótopos, marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), marcadores enzimáticos (tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, etc.) marcadores fluorescentes o luminiscentes o bioluminiscentes, (tales como FITC o rodamina, etc.), átomos paramagnéticos, y similares. Los procedimientos para llevar a cabo tal marcación son bien conocidos en la técnica; por ejemplo Ver (Sternber, L.A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W.J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

"Marca" se refiere a un compuesto detectable o composición detectable que es conjugada directa o

indirectamente al anticuerpo. La marca puede en si misma ser detectable por si misma (por ejemplo, marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que es detectable. Alternativamente, la marca puede no ser detectable por si misma pero puede ser un elemento que es ligado por otro agente que es detectable (por ejemplo una tarjeta epítopo o uno de un par socio de ligado tal como biodin-avidina, etc.). Así, el anticuerpo puede comprender una marca o tarjeta que facilita su aislamiento, y los métodos de la invención para identificar anticuerpos influye una etapa de aislamiento del anticuerpo/M-CSF por medio de la interacción con la marca o tarjeta.

Inmunoconjugados terapéuticos ilustrativos comprenden el anticuerpo descrito aquí conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina activa enzimáticamente de bacterias, hongos, plantas o de origen animal, o fragmentos de ellos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Las proteínas de fusión son descritas en mayor detalle más adelante.

La producción de inmunoconjugados esta descrita en la Patente Estadounidense No. 6,306,393. Los inmunoconjugados pueden ser preparados por medio de conjugar indirectamente un agente terapéutico a un componente de anticuerpo. Las

361

técnicas generales son descritas en Shih et al., Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); y Shih et al., Patente Estadounidense No. 5,057,313. El método general involucra hacer reaccionar un componente de anticuerpo que tiene una porción de carbohidrato oxidada con un polímero de vehículo que tiene por lo menos una función de amina libre y que es cargado con una pluralidad de drogas toxinas, quelatores, adenados de boro, y otros agentes terapéuticos. Esta reacción resulta en un enlace de base Schiff inicial (imina), que puede ser estabilizado por la reducción a una amina secundaria para formar el conjugado final.

El polímero de vehículo es preferiblemente un aminodextrano o polipéptido de por lo menos 50 residuos de aminoácido, aunque otros vehículos de polímero equivalentes sustancialmente pueden también ser usados. Preferiblemente, el inmunoconjugado final es soluble en una solución acuosa, tal como un suero de mamífero, para facilidad e administración y objetivado efectivo para uso en la terapia.

Así, las funciones solubilizantes sobre el polímero vehículo mejorarán la solubilidad del suero del inmunoconjugado final. En particular, un aminodextrano será el preferido.

362

El proceso para preparar un inmunoconjugado con un vehículo de aminodextrano típicamente se inicia con un polímero de dextran, ventajosamente un dextrano de peso molecular promedio en cerca de 10,000-100,000. El dextrano se hace reaccionar con un agente oxidante para afectar una oxidación controlada de una porción de sus anillos carbohidrato para generar grupos aldehído. La oxidación es efectuada convenientemente con reactivos químicos glicolíticos tales como $NaIO_4$, de acuerdo con procedimientos convencionales.

El dextrano oxidado se hace reaccionar entonces con una poliamina, preferiblemente una diamina y más preferiblemente, un mono- o polihidroxi diamina. Las aminas adecuadas incluyen diamina de etileno, diamina de propileno, o similares diaminas de polimetileno, triamina de dietileno o similares poliaminas, 1,3-diamino-2-hidroxipropano, u otras diaminas hidroxiladas similares o poliaminas, y similares. Un exceso de la diamina con relación a los grupos aldehídos del dextrano es usado para asegurar una conversión sustancialmente completa de las funciones aldehído a los grupos de la base Schiff.

Un agente reductor, tal como $NaBH_4$, $NaBH_3$ CN o similares, es usado para efectuar la estabilización reductiva del intermedio de base Schiff resultante. El aducto resultante

puede ser purificado por el pasaje a través de una columna de tamaño convencional para remover los dextranos reticulados.

Otros métodos convencionales para derivar un dextrano para introducir funciones de amina pueden ser también usados, por ejemplo, reacción con bromuro de cianógeno, seguido por una reacción con una diamina.

El aminodextrano se hace reaccionar entonces con un derivado de una droga particular, toxina, quelante, inmunodmodulador, adendo de boro, u otro agente terapéutico para ser cargado, en una forma activada, preferiblemente, un derivado activado por carboxilo, preparado por medios convencionales, por ejemplo, usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) o una variante soluble en agua del mismo, para formar un aducto intermedio.

Alternativamente, toxinas de polipéptido tales como la proteína antiviral de la hierba carmín o cadena A de ricino, y similares, pueden ser acoplados a la aminodextrano por medio de condensación glutaraldehído o por la reacción de grupos carboxilo activados sobre la proteína con aminas en el aminodextran.

Los quelantes por radiometales o mejoradores de resonancia magnética son bien conocidos en la técnica. Los derivados de ácido etilendiaminetetracético (EDTA) típicos y

364

ácido dietilentriaminepentaacético (DTPA). Estos quelantes típicamente tienen grupos sobre la cadena lateral por medio de los cuales el quelante puede ser ligado a un vehículo. Tales grupos incluyen, por ejemplo benzilisotiocianato, por medio del cual el DTPA o EDTA pueden ser acolados al grupo amina de un vehículo. Alternativamente, los grupos carboxilo o los grupos amina sobre el quelante pueden ser acoplados a un vehículo por la activación o derivación anterior y luego acoplamiento, todos medios bien conocidos.

Los adendos de boro, tales como carboranos, pueden ser ligados a componentes de anticuerpo por métodos convencionales. Por ejemplo, carboranos pueden ser preparados con funciones carboxilo o sobre cadenas laterales pendientes, lo que es bien conocido en la técnica. El ligado de tales carboranos ha un vehículo, por ejemplo aminodextran, pueden ser logrados por la activación de los grupos carboxilo de los carboranos y la condensación con aminas sobre el vehículo para producir un conjugado intermedio. Tales conjugados intermedios son entonces sujetados a los componentes de anticuerpo para producir inmunoconjugados terapéuticamente útiles, como se describe más adelante.

Un vehículo polipéptido puede ser usado en lugar de aminodextran, pero el vehículo polipéptido debería tener por lo menos 50 residuos de aminoácido en la cadena, preferiblemente entre 100 - 5000 residuos de aminoácido. Por

365

lo menos algunos de los aminoácidos deberían ser residuos de lisina o glutamato o residuos aspartato. Las aminas pendientes de residuo de lisina y carboxilatos pendientes de glutamina y de aspartato son convenientes para sujetar una droga, toxina, inmunomodulador, quelante, adendo de boro, o agente terapéutico. Ejemplos de vehículos polipéptidos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, copolímeros de ellos, y polímeros mezclados de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, cerinas, para conferir propiedades de solubilidad deseadas sobre el vehículo cargado resultante y el inmunoconjugado.

La conjugación del conjugado intermedio con el componente de anticuerpo es efectuado por medio de oxidar la porción carbohidrato del componente de anticuerpo y hacer reaccionar el aldehído resultante los carbonilos de aldehídos resultantes (y cetona) con grupos amino que permanecen en el vehículo después de cargar con una droga, toxina, quelante, inmunomodulador, adendo de boro, u otro agente terapéutico. Alternativamente, un conjugado intermedio puede ser sujetado a un componente de anticuerpo oxidado por vía de grupos amina que han sido introducidos en el conjugado intermedio y después cargarlo con el agente terapéutico. La oxidación es efectuada convenientemente sea químicamente, por ejemplo con $NaIO_4$ u otro reactivo glucolítico, o enzimáticamente, por ejemplo, con neuraminidasa y galactosa oxidasa. En el caso de un vehículo de aminodextran, no todas las minas del

aminodextrano son usadas típicamente para cargar un agente terapéutico. Las aminas restantes del aminodextrano se condensan con el componente de anticuerpo oxidado para formar los aductos de base Schiff, que luego son estabilizados reductivamente, normalmente con un agente reductor de borohidruro.

Procedimientos análogos son usados para producir otros inmunoconjugados de acuerdo con la invención. Los vehículos de polipéptido cargados preferiblemente tienen residuos de lisina libres que permanecen para la condensación con la porción de carbohidrato oxidado de un componente de anticuerpo. Los carboxilos sobre el vehículo de polipéptido pueden, si es necesario, ser convertidos a aminas, por ejemplo, activación con DCC y reacción con un exceso de una diamina.

El inmunoconjugado final es purificado usando técnicas convencionales, tales como cromatografía de dimensionado sobre Sephacryl S-300 o cromatografía de afinidad usando uno o más epítopos CD84Hy.

Alternativamente, los inmunoconjugados pueden ser preparados por medio de conjugar directamente un componente de anticuerpo con un agente terapéutico. El procedimiento general es análogo al método indirecto de conjugación excepto

que un agente terapéutico es ligado directamente a un componente de anticuerpo oxidado.

Podrá apreciarse que otros agentes terapéuticos pueden ser sustituidos quelantes descritos aquí. Aquellos de la técnica podrán visualizar los esquemas de conjugación sin experimentación indebida. Como una ilustración adicional, un agente terapéutico puede ser ligado a la región de bisagra de un componente de anticuerpo reducido por medio de la formación de enlace de disulfuro. Por ejemplo, los péptidos del toxoide de tétano pueden ser construidos con un residuo de cisteína único que es usado para sujetar el péptido a un componente de anticuerpo. Como una alternativa, tales péptidos pueden ser sujetados al componente de anticuerpo usando un reticulador heterobifunsional, tal como 3-(2-piridilditio)proprionato de N-succinilo (SPDP). Yu et al., Int. J. Cancer56: 244 (1994). Técnicas generales para tal conjugación son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upeslacis et al. ,"Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), paginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Enineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), paginas 60-84 (Cambridge University Press 1995).

Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico están hechos usando una variedad de agente de acoplamiento de proteína bifuncional tal como 3-(-piridilditiol)propionato de N-succiminidilo (SPDP), iminotiolano (IT, derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL) ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de fluor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenos). Por ejemplo, una inmunotóxina de ricino puede ser preparada según se describió en Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Ácido Carbón-14-marcado 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminepentaacetico (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación del redionuclido del anticuerpo (ver, por ejemplo, WO94/11026).

Como se describió anteriormente, las partes de carbohidrato en la región Fc de un anticuerpo pueden ser usadas para conjugar un agente terapéutico. Sin embargo, la región Fc puede estar ausente sin un fragmento de anticuerpo es usado como el componente de anticuerpo en el inmunoconjugado. Sin embargo, es posible introducir una parte

de carbohidrato en una región variable de cadena liviana de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo. Ver, por ejemplo, Leung et al., J. Immunol. 154: 5919 (1995); Hansen et al., Patente estadounidense No. 5,443, 953. La parte de carbohidrato hecho por ingeniería es entonces usada para ligar a un agente terapéutico.

En adición, aquellos versados en la técnica podrán reconocer numerosas variaciones posibles de los métodos de conjugación. Por ejemplo, la parte de carbohidrato puede ser usada para ligar polietilenglicol para poder extender la vida promedio de un anticuerpo intacto, o un fragmento de ligado antígeno del mismo, en sangre, linfo, u otros fluidos extracelulares. Más aún, es posible construir un "inmunoconjugado divalente" para ligar agentes terapéuticos a una parte de carbohidrato y a un grupo sulfhidrilo libre. Tal grupo sulfhidrilo libre puede ser localizado en la región de bisagra del componente de anticuerpo.

Proteínas de Fusión de Anticuerpo Anti-M-CSF

La presente invención contempla el uso de proteínas de fusión que comprenden una o más partes de anticuerpo anti-M-CSF y un inmunomodulador o parte de toxina. Los métodos de hacer proteína de fusión de anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6,306,393. Las proteínas de fusión de anticuerpo comprenden

una parte de interleucina-2 son descritas por Boleti et al., Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet et al., Cancer Gene Ther. 2: 161 (1995), Becker et al., Proc. Nat´l Acad. Sci. USA 93: 7826 (1996), Hank et al., Clin. Cancer Res. 2: 1951 (1996), y Hu et al., Cancer Res. 56: 4998 (1996). En adición, Yang et al., Hum. Antibodies Hybridomas 6: 129 (1995), describe una proteína de fusión que incluye un fragmento $F(ab')_2$ y una parte alta del factor de necrosis tumoral.

Los métodos para hacer proteínas de fusión de anticuerpo- toxina en los cuales una molécula recombinante comprende uno o más componentes de anticuerpo y una toxina o agente quimioterapéutico son también conocidos por aquellos versados en la técnica. Por ejemplo, las proteínas de fusión de anticuerpo-*pseudomonas* de exotoxinas A han sido descritas por Chaudhary et al., Nature 339: 394 (1989), Brinkmann et al., Proc. Nat´l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra et al., Proc. Nat´l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman et al., J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels et al., Int. J. Can. 60: 137 (1995), Fominaya et al., J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan et al., Biochemistry 35:2872 (1996), y Schmidt et al., Int. J. Can. 65:538 (1996). Las proteínas de fusión anticuerpo- toxina contienen una parte de toxina de difteria que han sido descritas por Kreitman et al., Leukemia 7:553 (1993), Nicholls et al., J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson et al., J. Biol. Chem. 270:28037 (1995), y Vallera et al., Blood 88:2342 (1996). Deonarain et al., Tumor

371

Targeting 1:177 (1995), ha sido descrita una proteína de fusión anticuerpo-toxina que tiene una parte RNasa, mientras que Linardou et al., Cell Biophys. 24-25:243 (1994), produjo una proteína de fusión anticuerpo-toxina que comprende un componente DNasa I. La gelonina fue usada como la parte de toxina en la proteína de fusión anticuerpo-toxina de Wang et al., Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Abril. 2-6,1995, Parte 1, BIOT005. Como un ejemplo adicional, Dohlsten et al., Proc. Nat´l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994), reportó una proteína de fusión anticuerpo-toxin que comprende el *Staphylococcal* enterotoxina-A.

La ilustración de toxinas que son adecuadamente empleadas en la preparación de tales conjugados son ricina, abrina, ribonucleasa, Dnasa I, enterotocin-A Staphylococcal, proteína anti viral de la hierba carmesí, gelonina, toxina dedifterina, exotoxina de pseudomonas, y endotoxinas de pseudomonas. Ver, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), y Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Otras toxinas adecuadas con conocidas por aquellos versados en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser usados en ADEPT por medio de conjugar el anticuerpo con una enzima activante de prodroga que convierte una prodroga (por ejemplo un agente quimioterapéutico de peptidilo, ver

372

WO81/01145) a una droga activa cáncer. Ver, por ejemplo WO88/07378 y la patente estadounidense No. 4,975,268.

El componente de enzima del inmunoconjugado útil para el ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre una prodroga de tal manera que la convierta en su forma citotóxica más activa. Las enzimas que son útiles en el método de esta invención incluyen, pero no están limitadas a, fosfatasa alcalina útil para convertir prodrogas que contienen fosfato en drogas libres; arilsulfatasa útil para convertir prodrogas que contienen sulfato en drogas libres; citosina deaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxina en la droga anticáncer, 5-fluorouracil; proteasas, tales como la proteasa serracia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que son útiles para convertir prodrogas que contienen péptidos en drogas libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir prodrogas que contienen sustituyentes de aminoácidos de; enzimas de rompimiento de carbohidratos tales como β-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir prodrogas glicosiladas en drogas libres; β-lactamasa útil para convertir drogas deerivadas con β-lactamas en drogas libres; y amidasas de penicilina, tal como la amidasa de penicilina V o la amidasa de penicilina G, útiles para convertir drogas derivadas en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en drogas libres. Alternativamente los anticuerpos con actividad

373

enzimática, también conocidos en la técnica como abzimas, pueden ser usados para convertir las prodrogas de la invención en drogas activas libres (ver, por ejemplo, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden ser preparados como se describió aquí para el suministro de la abzima a una población celular de tumor.

Las enzimas de esta invención pueden ser ligadas covalentemente a los anticuerpos por técnicas bien conocidas en el arte tales como el uso de reactivos de reticulación heterobifuncionales discutidos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión comprenden por lo menos la región de ligado del antígeno de un anticuerpo de la invención ligado a por lo menos una porción activa funcionalmente de una enzima de la invención que puede ser construida usando las técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el arte (Ver, por ejemplo, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984))

Usos No Terapéuticos

Los anticuerpos de la invención pueden ser usados como agentes de purificación de afinidad para M-CSF o en ensayos de diagnóstico para la proteína M-CSF, por ejemplo, detectar su expresión en células específicas, tejidos o suero. Los anticuerpos también pueden ser usados para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, para aquellos propósitos

el anticuerpo es marcado con un radionuclido (tal como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{125}I, ^{3}H, ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor pueda ser localizado utilizando inmunoscintiografía.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser empleados en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de ligado competitivo, ensayos de emparedado directo e indirecto, tales como ELISA, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987). Los anticuerpos también pueden ser usados para la inmunoistoquímica, para marcar muestras de tumor usando métodos conocidos en la técnica.

Como materia de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención puede ser suministrado en un kit, es decir una combinación empacada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar acabo el ensayo de diagnóstico. En donde el anticuerpo es marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que suministre el cromóforo o fluoróforo detectable). En adición, otros aditivos pueden ser incluidos tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloque o amortiguador de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden ser variadas ampliamente para suministrar concentraciones en

375

solución de los reactivos que optimice sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden ser suministrados como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución suministraran una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

La invención es ilustrada por los siguientes ejemplos, que no tienen el propósito de limitarla de ninguna manera.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Este ejemplo muestra que los anticuerpos de M-CSF RX y 5ª1 son especies específicas y que los anticuerpos RX1 MC, y MC3 neutralizan la actividad del M-CSF humana. El RX1 es un anticuerpo vendido comercialmente que estuvo disponible por más de un año antes de la fecha de presentación de esta solicitud. Las fuentes comerciales ilustrativas incluyen, pero no se, limitan a, clones de anticuerpo monoclonal del M-CSF humano antihumano de ratón 116,692, y 21 (Anogen); clones de anticuerpo del M-CSF antihumano 21113.131,26730, y 26786 (R & D Systems, Inc; y el anticuerpo clon M16 del M-CSF antihumano (Antigenix America, Inc.).

376

Para ensayar la actividad neutralizante del RX1 y el 5A1, un ensayo de proliferación de la línea de células M-MFS-60 fue usada (American Type Culture Collection Accesión No. CRL-1838, disponible del ATCC en Rockville, MD, USA, derivado de una leucemia mielogenosa inducida con el retrovirus ecotrópico de ratón natural Cas-Br-MuLV, que responde tanto a la interleucina 3 y al M-CSF y que contiene un c-myb proto-oncogen truncado causado por la integración de un retrovirus). La proliferación del M-NFS-60 requiere el M-CSF activo en una manera dependiente de dosis. En el ensayo, las células de M-NFS-60 fueron lavadas y puestas en placas en un medio de RPMI 1640 con 10% de FBS y 3000 U/ml de M-CSF y 1% de Pen/Strep. El M-CFS humano recombinante (a 10 ng/ml de concentración final), específico de murino o humano, fue incubado con varias concentraciones de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en 5% de CO_2 en una incubadora.

Luego de la incubación, la mezcla fue agregada al cultivo de M-NFS-60 en placas microtítulo de 96 pozos. El volumen del ensayo total por pozo fu de 100 µl, con 10 mg/ml de M-CSF, y en la concentración del anticuerpo indicada en la figura 5. Las células fueron incubadas a 37°C bajo 5% de CO_2 durante 72 horas antes de que el número celular fuera cuantificado por el ensayo CellTiter Glo (Promega). El ensayo anteriormente mencionado fue repetido para anticuerpos MC3 y MC1.

377

Como se muestra en la Figura 5 los anticuerpos RX1 y 5A1 del M-CSF son especies específicas. La proliferación celular es presentada como una lectura fluorescente del ensayo CellTiter Glo, que es lineal con el número de células. Las especies específicas con actividad neutralizante del RX1 y 5A1 se muestran por su habilidad para inhibir el M-NFS-60 en la presencia de M-CSF sea humano o de murino. Finalmente, como se muestra en la Figura 5B, los anticuerpos MC3 y MC1 también son inhibidores efectivos de la actividad del M-CSF.

EJEMPLO 2

Este ejemplo muestra que el anticuerpo RX1 inhibe efectivamente las osteólisis en modelos de xenoingerto humano a una dosis de 5 mg/kg. Ratones desnudos hembras de edad de 4-7 semanas, pesa promedio aproximadamente 20 g fueron usados en este estudio. Células tumorales (MDA-MB-231, $3X10^5$) suspendidas en 10 µl de salina fueron inyectadas en la cavidad de la médula del hueso tibia derecho. Radiogramas de las patas traseras fueron tomados un día después de la inoclusión del tumor para obtener imagen de línea base y verificar si hay fracturas del hueso causadas por la inyección. Los ratones fueron puestos en grupos de tratamiento aleatoriamente en 10 ratones por grupo incluyendo PBS y RX1 a 5 mg/kg, inyectado i.p. una vez a la semana durante 6 semanas. Al final del estudio, los radiogramas de las patas traseras fueron tomados nuevamente comparadas

contra la línea base para detectar el daño del hueso. El grado del daño del hueso causado por el tumor fue definido como se muestra en la figura 6. El grupo con el tratamiento con RX1 de 5 mg/kg mostró una protección estadísticamente significativa del hueso contra el daño causado por el tumor.

EJEMPLO 3

Este ejemplo muestra que el número de metástasis es reducido cuando el anticuerpo RX1 es administrado al cáncer de pecho humano MDA-MB-231 en ratones desnudos a una concentración de 5 mg/kg.

Los ratones desnudos hembras de edad de 4-7 semana, peso promedio aproximadamente 20 g fueron usados para este estudio. Las células de tumor (MDA-MB-231, $3x10^5$) suspendidas en 10 µl de salina fueron inyectadas dentro de la cavidad de la médula ósea de la tibia derecha. Los radiogramas de las patas traseras se tomaron un día después de la inoculación del tumor para obtener imagen de la línea base y revisar la fractura del hueso originada por la inyección Los ratones se agruparon aleatoriamente en los grupos de tratamiento que incluyen PBS y RX1 en 5 mg/kg inyectado i.p. una vez a la semana durante 6 semanas. AL final del estudio, los pulmones de cada grupo de tratamiento se recolectan y se fijan en solución Bouin para conteo de nódulos de pulmón metastásicos.

379

Como se muestra en la Figura 7, que el número de metástasis se reduce cuando se administra el anticuerpo RX1 al MDA-Muf-Butirato-231 de cáncer de seno humano que lleva nudos de ratón en una dosis de 5 mg/kg.

EJEMPLO 4

Este ejemplo establece un procedimiento para la humanización del anticuerpo RX1. El 5H4, MC1 y MC3 se humanizan utilizando procedimientos similares.

Diseño de genes para cadenas livianas y pesadas RX1 humanizadas

La secuencia de aminoácido y ácido nucleótido para RX de murino se establecen en la figura 4B. La secuencia de un anticuerpo humano identificado utilizando el National Biomedical Fundation Protein Identification Resource o bases de datos similares se utiliza para suministrar la estructura del anticuerpo humanizado. Para seleccionar la secuencia de la cadena pesada humanizada, la secuencia de cadena pesada RX1 de murino se alinea con la secuencia de la cadena pesada de anticuerpo humano. En cada posición, el aminoácido de anticuerpo humano se selecciona para la secuencia humanizada, a menos que la posición caiga en una de las cuatro categorías definidas adelante, en cuyo caso se selecciona el aminoácido RX1 de murino:

380

(1) La posición cae dentro de una región de determinación de complementariedad (CDR), como se define por Kabat, J. Immunol., 125, 961-969 (1980);

(2) El aminoácido de anticuerpo humano es raro para las cadenas pesadas humanas en esa posición, mientras que el aminoácido RX1 de murino es común para cadenas pesadas humanas en esa posición;

(3) La posición esta inmediatamente adyacente a un CDR en la secuencia de aminoácido de la cadena pesada RX1 de murino; o

(4) Modelar en 3 dimensiones el anticuerpo RX1 de murino lo que sugiere que el aminoácido está físicamente cercano a la región de unión del antígeno.

Para seleccionar la secuencia de la cadena liviana humanizada, la secuencia de cadena liviana RX1 de murino se alinea con la secuencia de la cadena liviana de anticuerpo humano. El aminoácido de anticuerpo humano se selecciona en cada posición para la secuencia humanizada, a menos que la posición de nuevo caiga dentro de una de las cuatro características descritas anteriormente y repetidas adelante:

(1) CDR;

381

(2) Aminoácido RX1 de murino más típico que el anticuerpo humano;

(3) Adyacente al CDR; o

(4) Proximidad de 3 dimensiones posibles para la región de unión.

La secuencia de nucleótido actual de los genes de cadena liviana y pesada se selecciona como sigue:

(1) El código de secuencias de nucleótido para las secuencias de aminoácido se escogen como se describió anteriormente;

(2) 5′ El código de secuencias de nucleótido para una secuencia líder (señal). Estas secuencias líder se escogen como típicos de anticuerpos;

(3) 3′ de las secuencias de codificación, las secuencias de nucleótido son las secuencias que siguen el segmento J5 de cadena liviana de ratón y el segmento J2 de cadena pesada de ratón, que son parte de la secuencia RX1 de murrina. Estas secuencias se incluyen debido a que ellas contienen señales de empalme de donante; y

(4) En cada extremo de la secuencia hay un sitio Xba para permitir cortar en los sitios Xba I y clonarlos en el sitio Xba I de un vector.

382

Construcción de genes de cadena liviana y pesada humanizada

Para sintetizar la cadena pesada, se sintetizan cuatro oligonucleótidos utilizando un sintetizador de ADN Applied Biosystems 308B. Dos de los oligonucleótidos son parte de cada hebra de la cadena pesada y cada oligonucleótido traslapa al siguiente por aproximadamente 20 nucleótidos para permitir la anulación. Juntos, los oligonucleótidos cubren la región de variable de cadena pesada humanizada completa con unos pocos nucleótidos extra en cada extremos para permitir el corte en los sitios Xba I. Los oligonucleótidos se purifican a partir de geles de poliacrilamida.

Cada oligonucleótido se fosforila utilizando ATP y quinaza de polinucleótido T4 mediante procedimiento estándar (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Para anular los oligonucleótidos fosforilados ellos se suspenden juntos en 40 ul de TA (33 mM de acetato Tris, pH 7.9, 66 mM de acetato de potasio, 10 mM de acetato de magnesio) en una concentración de aproximadamente 3.75 uM cada uno, calentado a 95°C durante 4 min. y enfriado lentamente a 4°C. Al sintetizar la hebra opuesta de cada oligonucleótido, se agregan los siguientes componentes en un volumen final de 100 ul:

383

10 ul	Oligonucleótidos anulados
0.16 mM	Cada desoxirribonucleótido
0.5 mM	ATP
0.5 mM	DDT
100 ug/ml	BSA
3.5 ug/ml	Proteína T4 g43 (polimerasa ADN)
25 ug/ml	Proteína T4 g42/62 (proteína de polimerasa accesoria)
25 ug/ml	Proteína 45 (proteína polimerasa accesoria)

La mezcla se incuba a 37°C durante 30 min. Luego 10 u de ligaza de ADN T4 se agrega e incuba a 37°C y se recupera durante 30 min. La polimerasa y la ligasa se inactivan mediante incubación de la reacción a 70°C durante 15 min. Para digerir el gen con Xba I, 50 ul de 2X TA que contiene BSA a ug/ml y DTT en 1 mM, 43 ul de agua, y 50 u de Xba I en 5 ul se agrega a la reacción. La reacción se incuba durante 3 hr a 37°C, y luego se purifica sobre un gel. El fragmento Xba I se purifica a partir de un gel y se clona en el sitio Xba I del plásmido pUC19 por métodos estándar. Los plásmidos se purifican utilizando técnicas estándar y se secuencian utilizando el método dideoxi.

Construcción de plásmidos para expresar cadenas livianas y pesadas humanizadas se acompaña por el aislamiento de los fragmentos Xba I de cadena liviana y pesada del plásmido pUC19 en el que este se ha insertado y luego insertarlo dentro del sitio Xba I de un vector de expresión apropiado

384

que expresará altos niveles de una cadena pesada completa cuando se transfecta dentro de una célula huésped apropiada.

Síntesis y afinidad de anticuerpo humanizado

Los vectores de expresión se transfectan en células de ratón Sp2/0, y las células que integran los plásmidos se seleccionan sobre la base de marcadores seleccionables conferidos por los vectores de expresión mediante métodos estándar. Para verificar que estas células secretaron anticuerpo que se une al M-CSF, el súper nadante de las células se incuba con células que son conocidas por expresar el M-CSF. Después de lavar, las células se incuban con anticuerpo antihumano de cabra conjugado con fluoresceína, se lava, y analiza para fluorescencia en un citofluorómetro FACSCAN.

Para los siguientes experimentos, las células que producen el anticuerpo humanizado se inyectan enratones, y los ascitos resultantes se recolectan. El anticuerpo humanizado se purifica por homogeneidad sustancial de los ascitos al pasar a través de una columna de afinidad de anticuerpo de inmunoglobulina antihumano de cabra, preparado en un soporte Affigel-10 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmon, Calif.) De acuerdo con técnicas estándar. Para determinar la afinidad del anticuerpo humanizado relacionado con el anticuerpo RX1 de murino original, se desarrolla un

experimento de unión competitivo de acuerdo con técnicas conocidas en el arte.

EJEMPLO 4A

Este ejemplo describe la clonación y expresión de los anticuerpos RX1 Human Engineered™, así como también la purificación de tales anticuerpos y ensayarlos para actividad de unión. Los anticuerpos MC3, MC1 y Human Engineered™ se preparan utilizando procedimientos similares.

Diseño de secuencias Human Engineered™

Human Engineered™ de dominios variables de anticuerpo se han descrito por Studnicka [ver, por ejemplo, Studnicka et al. Patente estadounidense No. 5,766,886; Studnicka et al. Protein Engineered: 805-814 (1994)] como un método para reducir la inmunogenicidad mientras se mantiene la actividad de unión de moléculas de anticuerpo. De acuerdo con el método, cada región de aminoácido variable se le ha asignado un riesgo de sustitución. Las sustituciones de aminoácidos se distinguen por una de tres categorías de riesgo: (1) cambios de bajo riesgo son aquellos que tienen el potencial más grande para reducir la inmunogenicidad con menos oportunidad de interrumpir la unión del antígeno; (2) moderar los cambios de riesgo son aquellos que pueden reducir adicionalmente la inmunogenicidad, pero tienen una mayor oportunidad de afectar la unión de antígeno o duplicar la proteína; (3) residuos de

386

alto riesgo son aquellos que son importantes para la unión o para mantener la estructura del anticuerpo y llevar el más alto riesgo que la unión de antígeno o duplicación de proteína se pueda afectar. Debido al papel estructural tridimensional de las prolinas, las modificaciones en las prolinas se consideran generalmente que son al menos de cambios de riego moderado, aún si la posición es típicamente una posición de bajo riesgo. Los cambios de sustitución se prefieren pero también son posibles inserciones y eliminaciones. Las figuras 4B y 4C muestran el traspaso del riego para cada residuo de aminoácido de cadenas liviana y pesada RX1 de murino, respectivamente, categorizada como un cambio de bajo riesgo, alto riesgo o riesgo moderado.

Regiones variables de las cadenas liviana y pesada del anticuerpo RX1 de murino se hace Human Engineered™ utilizando este método. Los residuos de aminoácido que son candidatos para modificación de acuerdo con el método en posiciones de bajo riego se identifican al alinear las secuencias de aminoácido de las regiones variables de murino con una secuencia de región variable humana. Se puede utilizar cualquier región variable human, que incluye una secuencia VH o VL individual o una secuencia VH o VL consenso humana. Los residuos de aminoácido en cualquier número de las posiciones de bajos riesgo, o en todas de las posiciones de bajo riesgo, se pueden cambiar. Para la secuencia de cadena pesada "de bajo riesgo" Human Engineered™ en las figuras 19A-B, se

387

utiliza Vh2 consenso humano (basado en Kabat) como la plantilla, y para cada posición en donde los residuos de aminoácido humano y de murino difieren en los posiciones de bajo riesgo, se introduce una modificación de aminoácido que reemplaza el residuo murino con el residuo humano. Para la secuencia de cadena liviana "bajo riesgo" Human Engineered™ en las figuras 20A-B, se utiliza kappa 3 consenso humano (basado en kabat) como la plantilla, y para cada posición en donde los residuos de aminoácido humano y de murino difieren en las posiciones de bajo riesgo, se introduce una modificación de aminoácido que reemplaza el residuo murino con el residuo humano. Se hace un total de 16 modificaciones de bajo riesgo de aminoácido a la cadena liviana y 8 modificaciones de bajo riesgo a la cadena pesada.

De forma similar, los residuos de aminoácido que son candidatos para la modificación de acuerdo con el método en todas las posiciones de bajo y moderado riesgo se identifican al alinear las secuencias de aminoácido de las regiones variables de murino con una secuencia de región variable humana. Los residuos de aminoácido en cualquier número de las posiciones de bajo o moderado riesgo o en todas las posiciones de bajo y moderado riesgo, se pueden cambiar. Para la secuencia de cadena pesada Human Engineered™ en las figuras 19A-B, se utiliza el Vh2 consenso humano (basado en Kabat) como la plantilla, y para cada posición en donde los residuos de aminoácido humano y de murino difieren en las

posiciones de bajo o moderado riesgo, se introduce una modificación de aminoácido que reemplaza el residuo murino con el residuo humano. Para la secuencia de cadena liviana Human Engineered™ en las figuras 20A-B, se utiliza kappa 3 consenso humano (basado en Kabat) como la plantilla, y para cada posición en donde los residuos de aminoácido humano y de murino difieren en las posiciones de bajo o moderado riesgo, se introduce una modificación de aminoácido que reemplaza el residuo murino con el residuo humano. Un total de 19 modificaciones de aminoácido de bajo o moderado riesgo se hacen para la cadena liviana y 12 modificaciones de moderado y bajo riesgo se hacen para la cadena pesada.

Una secuencia de cadena liviana "alternativo bajo riesgo" también se prepara como se muestra en las figuras 21A-B, en la que la modificación en la posición 54 se reversa a murino. Una secuencia de cadena "liviana alternativa bajo + moderado riesgo" también se prepara como se muestra en las figuras 21A-B en la que las modificaciones en las posiciones 54-56 se reversan a murino.

Finalmente una secuencia de región V de cadena liviana "bajo + moderado riesgo" Human Engineered™ también se produce utilizando el subgrupo 2-1-(1) A14 de línea germinal humana VK6 como la plantilla, como se muestra en las figuras 22A-B.

389

También se contempla por la presente invención retener los aminoácidos 41-43 (NGS) de la figura 4A que representa el sitio de glicosilación. Alternativamente, solo uno o dos de los aminoácidos 41-43 (por ejemplo NG) se pueden retener.

Preparación de los vectores de expresión para desarrollo de línea celular permanente

Los fragmentos de ADN que codifican cada una de las secuencias de región V de cadena liviana y cadena pesada descritos anteriormente junto con las secuencias de señal derivadas de anticuerpo se construyen utilizando síntesis de nucleótido sintético. El ADN que codifica cada una de las secuencias de aminoácido de región V de cadena liviana descritas anteriormente se insertan dentro del vector pMCP10 que contiene la región constante de cadena liviana capa humana. La región que codifica cada una de las secuencias de aminoácido de región V de cadena pesada descritas anteriormente se insertan dentro del vector pMXP6 que contiene la región constante de cadena pesada Gama-2 human. Se construyen vectores adicionales que contienen la secuencia de aminoácidos de región V de cadena pesada fusionados a las regiones constantes gama-4 (cADN y genómico) y gama-1 (cADN)) que tienen secuencias mostradas en las figuras 29A, 29B, y 30. Todos estos vectores contienen un promotor hCMV y una región no traducida 3′ de cadena liviana kappa de ratón así como también genes marcadores seleccionables tales como *neo* o

390

his para selección de transfectantes resistentes- o histidinol-G418, respectivamente. Los vectores de cadena liviana y pesada se describen en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Vectores de cadena liviana Kappa permanentes gen sencillo.

Plásmido	**Región V**	**Marcador Selectivo**
pMXC5	Riesgo Bajo + Mod.(Kabat)	*neo*
PMXC6	Riesgo Bajo (Kabat)	*neo*
PMXC13	Riesgo Bajo (Kabat) - R54 a S	*neo*
PMXC14	Riesgo Bajo + Mod.(Kabat)- RAT54,55,56 a SIS	*neo*
PMXC22	Riesgo Bajo + Mod.(Línea germinal)	*neo*

Tabla 3. Vectores de cadena pesada permanente gen sencillo

Plásmido	**Región V**	**Región C**	**Marcador Selectivo**
PMXC7	Riesgo Bajo+Mod. (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC8	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2	*neo*
PMXC40	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 1	*neo*
PMXC41	Riesgo Bajo+Mod. (Kabat)	Gama 1	*neo*
PMXC45	Riesgo Bajo+Mod. (Kabat)	Gama 4 (genómico)	*neo*
PMXC46	Riesgo Bajo+Mod. (Kabat)	Gama 4 (cADN)	*neo*

Vectores que comprenden los genes de cadena pesada más liviana Human Engineered™ deseados (Gama-1, Gama-2 y Gama-4) se construyen. Estos vectores "2-Gen" que contienen genes que acidifican cada cadena de anticuerpo, pesada y liviana, bajo

391

control del promotor hCMV, donante de empalme CMV, aceptador de empalme SV40 16S y el ADN no traducido 3´ de cadena liviana kappa de ratón incluye el sitio poliA. Ellos también contiene un gen marcador seleccionable tal como *neo*, o *his* y el gen de resistencia a la ampicilina. Los vectores que contienen ambos genes de cadena liviana y pesada se describen en la Tabla 4. Los vectores que comprenden dos copias de cada gen de cadena liviana y pesada (4 vectores de genes) también se construye.

Tabla 4. vectores de expresión de dos genes permanentes.

		Cadena Pesada		
Plásmido	**Cadena Liviana Kappa**	**Región V**	**Región C**	**Marcador Selectivo**
PMXC12	Riesgo Bajo (Kabat)	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2	*neo*
PMXC37	Riesgo Bajo (Kabat)	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2	*his*
PMXC9	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 2	*neo*
PMXC16	Riesgo Bajo (Kabat)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC17	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC18	Riesgo Bajo (Kabat) R54 a S	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC19	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)- RAT54,55,56 a SIS	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 2	*Neo*

392

PMXC20	Riesgo Bajo (Kabat)-R54 a S	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC21	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)- RAT54,55,56 a SISTEMAS	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC25	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC47	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 2	*His*
PMXC26	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2	*Neo*
PMXC42	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 1	*Neo*
PMXC43	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 1	*neo*
PMXC50	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 1	*His*
PMXC48	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 4 (cADN)	*Neo*
PMXC49	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	Gama 4 (genómico)	*Neo*

Preparación de vectores de expresión para expresión transitoria

Los vectores que contienen los genes de cadena liviana o pesada descritos anteriormente también se construyen para transfección transitoria. Estos vectores son similares a aquellos descritos anteriormente para transfecciones

393

permanentes excepto que en cambio de los genes *neo* o *his*, ellos contienen el virus Epstein-Barr *oriP* para replicación en células HEK293 que expresan el antígeno nuclear del virus Epstein-Barr. Los vectores para transfección transitoria se describen en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Vectores de cadena liviana Kappa transitorios

Plásmido	Región V
pMXC1	Riesgo bajo +Mod (Kabat)
pMXC2	Riesgo Bajo (Kabat)
pMXC10	Riesgo bajo +Mod (Kabat)-RAT54,55,56 o SIS
pMXC11	Bajo Riesgo (Kabat)-R54 a S
pMXC15	Riesgo bajo +Mod (Línea germinal)

Tabla 6. Vectores de cadena pesada transitorios.

Plásmido	Región V	Región C
PMXC3	Riego Bajo +Mod (Kabat)	Gama 2
PMXC4	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 2
PMXC29	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 1
PMXC38	Riesgo Bajo (Kabat)	Gama 4 (genómico)
PMXC39	Riesgo Bajo +Mod (Kabat)	Gama 1

Expresión Transitoria de RX1 Human-Engineered en células HEK293E

Vectores separados cada uno contiene *oriP* del virus Epstein-Barr y los genes de cadena liviana o pesada descritos anteriormente se transfectan transitoriamente en células HEK293E. A las células transfectadas transitoriamente se le

394

permite incubar hasta 10 días después que el súper nadante se recupera y se purifica el anticuerpo utilizando cromatografía de proteína A. Las proteínas producidas por las transfección transitoria de las células 293E se describen en la tabla 7 adelante.

Tabla 7. Anticuerpos preparados RX1 Human-Engineered

	Cadena Liviana		Cadena Pesada	
Anticuerpo	**Plásmido**	**Proteína**	**Plásmido**	**Proteína**
heRX1-1.G2	pMXC2	Riesgo Bajo (Kabat)	pMXC4	Riesgo Bajo (Kabat)
heRX1-2.G2	pMXC2	Riesgo Bajo(Kabat)	pMXC3	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)
heRX1-3.G2	pMXC1	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	pMXC4	Riesgo Bajo (Kabat)
heRX1-4.G2	pMXC1	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)	pMXC3	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)
heRX1-5.G2	pMXC11	Riesgo Bajo (Kabat) -R54 a S	pMXC4	Riesgo Bajo (Kabat)
heRX1-6.G2	pMXC11	Riesgo Bajo (Kabat) -R54 a S	pMXC4	Riesgo Bajo (Kabat)
heRX1-7.G2	pMXC10	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)- RAT54,55,56 a SISTEMAS	pMXC4	Riesgo Bajo (Kabat)
heRX1-8.G2	pMXC10	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)- RAT54,55,56 a SISTEMAS	pMXC3	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)
heRX1-9.G2	pMXC15	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	pMXC4	Riesgo Bajo (Kabat)
heRX1-10.G2	pMXC15	Riesgo Bajo+Mod	pMXC3	Riesgo

395

		(Línea germinal)		Bajo+Mod (Kabat)
heRX1-1.G1	pMXC2	Riesgo Bajo (Línea germinal)	pMXC29	Riesgo Bajo (Kabat)
heRX1-10.G1	pMXC15	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	pMXC39	Riesgo Bajo+Mod (Kabat)
heRX1-9.G4	pMXC15	Riesgo Bajo+Mod (Línea germinal)	pMXC38	Riesgo Bajo (Kabat)

Desarrollo de Células CHO-K1 Transfectadas Permanentemente

Los vectores descritos anteriormente (Tabla 4) que contienen una copia cada uno de los genes de cadena liviana y pesada se transfectan juntos en células CHO-K1 302 adaptadas Excell. Las células CHO-K1 adaptada para suspensión de crecimiento en medio Ex-Cell 302 se electropora típicamente con 40 ug de vector linealizado. Alternativamente, el ADN linealizado se puede completar con polietilenoimina lineal (PEI) y se utiliza para transfección. Las células se colocan en placas de 96 pozos que contienen medio Ex-Cell 302 complementado con 1% de FBS y G418. Se seleccionan los clones en placas de 96 pozos y el ~10% de clones superiores de cada transfección se transfieren a placas de 24 pozos que contienen medio Ex-Cell 302.

Se desarrolla un ensayo de productividad en placas de 24 pozos en medio Ex-Cell 302 para que los cultivos crezcan durante 7 y 14 días en los cuales el tiempo de cultivo de los

súper andantes se ensaya para niveles de anticuerpo secretados por un ensayo ELISA de inmunoglobulina para IgG.

Se transfieren los clones superiores a frascos de agitación que contienen medio Ex-Cell 302. Tan pronto como las células se adaptan al crecimiento de suspensión, un ensayo de frasco de agitación se desarrolla con estos clones en el medio Ex-Cell 302. Las células crecen durante 10 días en 125 ml en frascos Erlenmeyer que contienen 25 ml de medio. Los frascos se abren al menos día de por medio del periodo de incubación para permitir el intercambio de gas y los niveles de polipéptido de inmunoglobulina en el medio de cultivo se determinan por IgG ELISA al final del periodo de incubación. Múltiples transfecciones secuenciales de la misma línea de célula con dos o tres vectores de transcripción multi-unidad resulta en clones y las líneas de célula que exhiben incrementos adicionales en los niveles de producción de inmunoglobulina, preferiblemente a 300 µg/ml o más.

Purificación

Un proceso para la purificación de polipéptidos de inmunoglobulina a partir de vectores y todas la línea de acuerdo con la invención se puede diseñar. Des cuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, las células se remueven por filtración después de terminación. El filtrado se carga en una columna de proteína A (en múltiples pasos, sí se

397

necesita). La columna se lava y luego los polipéptidos de inmunoglobulina secretados y expresados se eluyen de la columna. Para la preparación del producto de anticuerpo, el grupo de proteína A se mantiene en un pH bajo (pH 3 durante un mínimo de 30 minutos y un Máximo DE 1 hora) como una etapa de inactivación viral. Una etapa de intercambio de catión absortivo se utiliza luego para purificación adicional del producto. El eluato de la columna de preparación absortiva se pasa a través de un filtro de retensión de virus para suministrar claridad adicional de las partículas virales potenciales. El filtrato se purifica adicionalmente al pasar a través de una columna de intercambio de anión en la que el producto no se une. Finalmente, el proceso de purificación se concluye mediante transferencia del producto en el amortiguador de formulación a través de diafiltración. El retentato se ajusta a una concentración de proteína de al menos 1 mg/mL y se agrega un estabilizador.

Actividad de Unión

La actividad de unión MCSF de los anticuerpos Human Engineeres™ recombinantes se evalúa. La proteína se purifica a partir de súper nadantes de cultivo en frascos de agitación al pasar sobre una columna de proteína A seguido por determinación de concentración mediante A_{280}. Se desarrollan ensayos de unión como se describe en el ejemplo 1 anterior o 12 adelante. Las placas Immulon II se precubren con antígeno

398

sM-CSF pre-diluido en una solución que contiene PBS para inmovilizarla a la micro placa. Varias concentraciones de ensayo del M-CSF que varían de 0.25 a 20 ug/ml se agregan a 50 ul/ pozo y se incuban a 4°C durante la noche. Las placas se lavan luego tres veces con PBS-0.05% Tween. Se realiza bloque al agregar en PBS- 0.05% Tween 1% BSA seguido por 30 minutos de incubación a 37°C. Las diluciones de polipéptidos de inmunoglobulina se preparan en solución PBS-0.05% Tween 1% BSA. Se preparan diluciones seriales dos o tres veces y se agregan (100 ul/pozo) en duplicado o triplicado. Después de una incubación de 90 minutos a 37°C, la micro placa se lava tres veces con PBS-0.05% Tween. Para desarrollo de señal, anticuerpo secundaria IgG antihumano de cabra (gamma o Fc-específico) conjugado a peroxidasa se agrega a cada pozo y se incuba durante 60 minutos a 37°C seguido por la adición de OPD a 0.4 mg/ml en amortiguador de citrato más 0.012 H_2O_2. Después de 5-10 minutos a temperatura ambiente el ensayo se define mediante la dicción de 100 ul 1M H_2SO_4 y las placas se leen a 490 nm. Ambos anticuerpos (Fc- especifico) IgG antihumano de cabra e IgG (gama-específico) antihumano de cabra se han empleado.

EJEMPLO 5

El siguiente ejemplo establece un procedimiento para el tratamiento de humanos que utilizan anticuerpo M-CSF-especifico, tal como un derivado RX1 o anticuerpo que compite

con RX1, que incluye un anticuerpo Human Engineered™ RX1 con una región constante IgG4 o IgG1 modificada o no modificada. El procedimiento también se puede seguir por un derivado MC3 o MC1 o anticuerpo que compite con MC3 o MC1. El rango de eficacia de dosis esperado es 2 ug/kg a 10 mg/kg. Esta estimación se basa en el siguiente fundamento sostenido por datos experimentales:

La medición del nivel M-CSF en el plasma humano (pacientes saludables y con cáncer de seno) es de aproximadamente 1 mg/ml. El RX1 de anticuerpo neutralizante M-CSF tiene un EC_{50} medido de 2 mg/ml contra 1 mg/ml de M-CSF humano. De acuerdo con esto, la concentración de anticuerpo efectivo en el plasma humano se espera sea de 10 50,000 veces sobre su EC_{50}, es decir 20 ng/ml a 100 ug/ml de anticuerpo en plasma humano. Basado en los estudio PK, con el fin de efectuar esa concentración en pacientes humanos, se requiere una dosis de 2 µg/kg a 10 mg/kg para alcanzar 20 ng/ml a 100 ug/ml de concentración de anticuerpo en plasma.

EJEMPLO 6

Este ejemplo establece un procedimiento para la evaluación de la actividad anticuerpo monoclonal anti-M-CSF en un modelo subcutáneo. El ejemplo 2 anterior muestra que el tratamiento de anticuerpo monoclonal anti-M-CSF inhibe significativamente el crecimiento del tumor en la medula

ósea. El propósito de este estudio es evaluar si el anticuerpo también puede inhibir el crecimiento del tumor en tejido blando.

Ratones un/un hembras en edad de 10 semanas, peso promedio ~20 g, se utilizaran para este estudio. Los ratones experimentaran un periodo de aclimatación de al menos 7 días antes de empezar el estudio. En el día 0, se inyectara el costado derecho de ratones desnudos con células cancerosas de colón humano SW620 subcutáneamente en $5X10^6$ células por ratón por 100µl. Cuando el volumen de tumor alcanza 100-200 mm^3 (usualmente una semana después de inoculación del tumor), los ratones se aleatorizarán en 5 grupos de 10 ratones por grupo como sigue:

1) PBS
2) RX1
3) 5A1
4) Control Ab isotipo mIgG1+rIgG1
5) 5A1+RX1

Los ratones se trataran intraperitonealmente con anticuerpos designados en 10mpk una vez a la semana durante 4 semanas. Cuando el volumen del tumor alcanza 2000 mm^3 se terminará el estudio. Alternativamente, los animales también se les practicará eutanasia cuado cualquiera de las siguientes situaciones se presenten: Ulceración de la

superficie de tumor es mayor del 30% del área de superficie de tumor total, significativa pérdida de peso corporal (> del 20%), deshidratación, y cuando están moribundo. Se recolectara la sangre completa de todos los ratones y la población de monocitos se analizará como un marcador subrogado potencial. El crecimiento de tumor/ tamaño se medirá mediante análisis 2-D. Las mediciones del ancho y largo del tumor se utilizaran para calcular el volumen del tumor. Se espera que el crecimiento del tumor en tejido blando se inhiba como un resultado del anterior experimento.

EJEMPLO 7

El siguiente ejemplo establece un procedimiento para la evaluación de una terapia de combinación para el tratamiento y prevención de enfermedades osteolíticas severas asociadas con metástasis de cáncer.

Diseño experimental. El estudio descrito en el ejemplo 5 anterior se repite esencialmente como se describe con las siguientes excepciones. Adicionalmente al anticuerpo o combinación de anticuerpo establecido en los grupos del tratamiento adelante, los animales recibirán uno de los siguientes tratamientos:

1. Bifosfonato (por ejemplo, Aredia; Zometa; Clodronato).

402

2. Cirugía

3. Radiación

4. Quimioterapia

5. Terapia de hormonas (por ejemplo, Tamoxifeno; terapia de anti-andrógeno)

6. Terapia de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes RANKL/RANK; anticuerpo neutralizante PTHrP)

7. Terapia de proteína terapéutica (por ejemplo, receptor RANKL soluble; OPG, e inhibidores PDGF y MMP)

8. Terapia de droga de molécula pequeña (por ejemplo, inhibidor Src-quinaza)

9. Terapia de oligonucleótidos (por ejemplo, PTHrP anti-sentido o RANK o RANKL)

10. terapia de genes (por ejemplo inhibidores RANK o RANKL)

11. Terapia de péptidos (por ejemplo muteinas de RANKL)

Los grupos de tratamiento son como sigue. Los tratamientos adicionales anteriores se indican adelante como "mas terapia X":

1. Solo PBS

2. tratamiento solo con terapia X

3. Isotipo de control IgG1 de rata

4. Isotipo de control IgG1 de murino

5. Solo MCSF antihumano RX1

6. Solo MCSF anti ratón IgG1 de rata 5ª1

7. combinación de isotipo de control IgG1 de murino e IgG1 de rata

8. Combinación 5ª1 y RX

9. Isotipo de control IgG1 de rata mas terapia X

10. Isotipo de control IgG1 de murino mas terapia X

11. MCSF antihumano RX1 mas terapia X

12. MCSF anti ratón IgG1 de rata 5ª1 mas terapia X

13. Combinación de control de isotipo IgG1 de murino e IgG1 de rata mas terapia X

14. Combinación 5ª1 y RX1 mas terapia X

Dosificación: Cada 0.1-30 mg/kg de anticuerpo se utiliza para administración a cada animal. La dosificación preferida es 10 mg/kg. La ruta de administración puede ser IV, IP, SC. La ruta preferida es IP. El tratamiento comenzara el día luego de la inyección de las células de tumor, como se describe en el ejemplo 5, anterior.

Mediciones. Para evaluar la severidad de la osteólisis entre los varios grupos de tratamiento, cada ratón recibe una imagen Faxitron de línea base tomada el día luego de la inyección de las células de tumor. También se toma una imagen Faxitron al final del estudio (8 semanas). Se mide simultáneamente el crecimiento del tumor utilizando el

sistema Xenogen en razón de que las células de tumor expresan luciferaza. Se espera que la terapia de combinación para el tratamiento y prevención de enfermedades osteolíticas severas asociadas con metástasis de cáncer se mejoraran con relación solo a la terapia de anticuerpo.

EJEMPLO 8

El siguiente ejemplo suministra un protocolo para evaluar la capacidad del anticuerpo M-CSF específico para unirse a, por ejemplo, células de cáncer de seno (línea celular ARH77) utilizando un clasificador de célula activado por fluorescencia.

Las células se lavan primero dos veces con PBS (no Ca^{2+}, Mg^{2+}). Para cada placa de 10-cm, se agrega 2ml de 3mM EDTA, y las pacas se incuban a 37°C durante 2-3 minutos, hasta que las células se redondean y empiezan a separarse del plato. Luego, se agrega 10 ml de amortiguador A (PBS + 5% FBS) y se mezcla. Al mismo tiempo, las células se agrupan y se resuspenden en aproximadamente $5x10^6$ células/ml en PBS+5% FBS, y las células se colocan en tubos a 100 µl/muestra.

En este punto, se agrega 0.1-10 ug/ml del anticuerpo primario (utilizado en la concentración indicada de anticuerpo M-CSF o anticuerpo de control). La dilución, si es necesaria, se hace en 5% FBS/PBS. La mezcla luego se incuba

durante 30 min a 4°C. Luego del periodo de incubación, las células se lavan 3 veces mediante incubación a 400 g durante 5 min., y las células se resuspenden en PBS.

El anticuerpo FITC o anti-IgG etiquetado PE (0.25 ug/muestra) se diluye en 1%BSA/PBS en la dilución optima, y las células se resuspenden en esta solución y se incuban durante 30 min a 4°C. Luego, se lavan las células 3 veces como se describió anteriormente. Luego las células se lavan, se resuspenden con 0.5 ml/muestra PI-PBS (si es necesario para distinguir células muertas de células vivas). Las células también se fijan para análisis posterior (las células pueden durar aproximadamente 3 días si se fijan con 0.1% de formaldehído). Las células se analizan luego en un FACS usando de fluorescencia activa utilizando procedimientos estándar.

Como se muestra en la Figura 8A y 8B, un anticuerpo MCSF específico RX1 se une a la línea de células de cáncer de seno MDA231 o a líneas de células de cáncer de mieloma múltiple ARH77 en una variedad de concentraciones de anticuerpo como se indicó.

EJEMPLO 9

El siguiente ejemplo muestra que el M-CSF es prevalerte sobre un número de superficies de células de cáncer. El

teñido inmunohistoquímico del M-CSF se lleva a cabo utilizando un anticuerpo M-CSF específico Rx1 y se lleva a cabo como sigue.

Al principio, se calienta en portaobjetos en un horno a 55-60°C durante 1 hora y se le permite enfriarse durante 2-3 minutos. Se utilizan los siguientes parámetros de rehidratación y desencerado:

a. Xileno	3 X 5 minutos
b. 100% de Alcohol Reactivo	2 X 5 minutos
c. 95% de Alcohol Reactivo	2 X 4 minutos
d. 75% de Alcohol Reactivo	2 X 3 minutos
e. 50% de Alcohol Reactivo	1 X 3 minutos
g. dI H_2O	2 - 3 enjuagues rápidos

Antes de la etapa de bloqueo de peroxido, se prepara la recuperación de antígeno utilizando 1 x Biogenex Citra Plus. La solución se pasa por microondas inicialmente a una energía completa hasta ebullición. Una vez la solución ha bullido, el microondas se configura rápidamente para otros 13 minutos en un nivel de energía 2, y se le permite enfriar antes de proceder. La etapa de bloqueo de peroxido se desarrolla como sigue. Se sumergen portaobjetos en 3% de H_2O_2 (25ml 30% a 250ml dI H_2O) y se coloca a una temperatura ambiente durante 10 minutos. Los portaobjetos se enjuagan luego 2 x con dI H_2O, y se lavan con 1 X PBS 2 x 2 minutos.

El procedimiento de bloqueo de avidina/biotina se desarrolla como sigue. Se colocan portaobjetos planos sobre un estante de metal. Se utiliza un esfero azul PAP (marcador de portaobjetos hidrófobo) alrededor del tejido. Luego, 2 gotas de Zymed Avidina (Reactivo A) -suficiente para cubrir el tejido- se agregan y se incuban los portaobjetos a temperatura ambiente durante 10 min. Luego de la incubación, se lavan los portaobjetos como sigue:

enjuagues 2 x 3 minutos en 1 X PBS

2 gotas de Zymed Biotin (Reactivo B), a temperatura ambiente durante 10 min.

lavadas 2 X 3 minutos en 1 X PBS.

El procedimiento de bloqueo de proteína se desarrolla como sigue. Primero, 10% de suero [a 2% de concentración final] de especies de anticuerpos secundarias se agrega. El BioGenex Power Block se diluye luego a 1X con dI H_2O. El estante de los portaobjetos se sumerge en Power Block durante 8 min. a temperatura ambiente, y los portaobjetos se enjuagan 2x en 1X PBS.

Para la adición del anticuerpo primario (RX1), se colocan los porta objetos planos sobre un estante de metal. Se agrega el anticuerpo para cubrir cada sección (~350µl), y el anticuerpo se esparce con la punta de una pipeta (si es

necesario) sin cepillar tejido. Los porta objetos se incuban luego durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se lavan los portaobjetos 3X con 1X PBS 3-5 minutos cada vez. En este punto, se aplica BioGenex Multi-Link a las secciones y se incuba durante 10-11 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se lavan luego 3 minutos cada vez.

El etiquetado se desarrolla al aplicar etiquetas BioGenex HRP a las secciones, que luego se incuban a temperatura ambiente durante 10- 11 min y se lavan con 1X PBS 3 x 3 minutos. Luego, se agrega sustrato Bio Genes H_2O_2 (una gota AEC cada 2.5 ml H_2O_2) a las secciones y se incuba a temperatura ambiente durante 10 min. Las secciones se enjuagan luego varias veces con dI H_2O. La etapa de contrateñido se desarrolla como sigue. Se tiñen las secciones con hematoxilín durante 1 minuto a temperatura ambiente. Luego, se enjuagan las secciones con H_2O dos veces, y luego se incuba en un X PBS durante 1 minuto. Las secciones se enjuagan luego bien con H_2O para remover el PBS. Las secciones se montan al aplicar una gota de BioGenex Super Mount a la sección y luego aire para secar durante la noche a temperatura ambiente.

Como se muestra en la Figura 9, el M-CSF es prevalente sobre un número de superficies de células de cáncer. Las

secciones de los tipos de células de cáncer indicadas se clasifican como sigue:

0	Sin teñido
1	El teñido es similar al fondo
2	Positivo, pero teñido débil
3	Positivo y teñido significativo
4	Positivo y teñido fuerte

EJEMPLO 10

Los siguientes ejemplos muestran el procedimiento para producir anticuerpo MC1 y MC3. El MC1 y MC3 son dos anticuerpos de murino monoclonal que neutralizan el anticuerpo M-CSF humano y se unen al M-CSF humano. Las secuencias de aminoácido de estos anticuerpos se muestran en las Figuras 14 y 15, respectivamente. Ellas se identifican por una serie de etapas que incluyen a) inmunización de ratón Balb C con M-CSF humano recombinante; b) seleccionar clones positivos que producen anticuerpo que se unen al M-CSF humano en un formato ELISA; c) subclonar clones positivos para generar clones hibridoma estables; d) cubrirse de cultivos de células para producir gran cantidad de anticuerpo; e) purificación y caracterización de anticuerpos en análisis de afinidad, unión celular, y ensayo de actividad de neutralización como se describe en los Ejemplos anteriores.

Las Figuras 16A y 16B muestran la alineación del CDR de las cadenas liviana y pesada, respectivamente,, de los anticuerpos RX1, 5, MCH y MC3.

Las versiones de Human Engineered™ y humanizado se generan como se describió en los Ejemplos anteriores.

EJEMPLO 11

Este ejemplo muestra que los anticuerpos M-CSF RX1 y 5H4, así como también los fragmentos Fab de estos, tiene diferentes actividades de neutralización. El siguiente ejemplo también muestra que los anticuerpos RX1, 5H4 y MC3 tienen afinidades que varían para el M-CSF. Este ejemplo demuestra adicionalmente que las afinidades de los anticuerpos intactos mencionados anteriormente son mayores con relación a los fragmentos Fab de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Las actividades de neutralización del RX1 y 5H4 intacto versus los fragmentos Fab de RX1 y 5H4 se determinan al medir la proliferación celular dependiente de M-CSF en la presencia de varias concentraciones de anticuerpo. La proliferación celular se determina por tinte de quimioluminiscencia. Como se muestra en la Figura 17, el RX1 intacto tiene la más alta potencia, mientras que el fragmento Fab del RX1 pierde su potencia y se comporta como 5H4 y el fragmento Fab 5H4.

Las propiedades de unión de los anticuerpos mencionados anteriormente se analizan utilizando análisis Biacore. Con el fin de determinar la afinidad relativa del RX1, 5H4, y MC3 a M-CSF, se inmoviliza el Fc anti-ratón de conejo en un chip biosensor CM5 por vía de acoplamiento de amina. Los anticuerpos mencionados anteriormente se capturan luego en el chip biosensor Fc/CM5 anti-ratón en 1.5 µg/ml durante 3 min a 2 µl/min. El MCSF se fluye sobre la superficie del biosensor modificado en concentraciones variantes (Rmax~15). Los anticuerpos de ensayo y el antígeno se diluyen en 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCL, 3mM EDTA, 0.005% tensoactivo P20 (HBS-EP). Todos los experimentos se desarrollan a 25°C. Se determinan las constantes de afinidad y cinéticas utilizando software Biaevaluation (Biacore) con un modelo de interacción 1:1/ ajuste global. Como se muestra adelante en la Tabla 8, las uniones RX1 al M-CSF con la mayor afinidad relativa para el 5H4 y MC3.

Tabla 8

	Ka (M-1 Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
RX1	1.64e6	2.7e-4	0.16
5H4	5.94e5	1.77e-3	3.0
MC3	7.04e5	1.93e-4	0.27

Para determinar las diferencias relativas en la afinidad de unión de los fragmentos Mab y Fab intactos de RX1, 5H4, y MC3, se utiliza una configuración alterna en el análisis

Biacore. Específicamente, se inmoviliza el M-CSF en el chip biosensor CM5 por vía de acoplamiento de amina. Se inyecta 0.05 µg/ml M-CSF en 10mM Na acetato pH 4.0 en 1µl/min durante 5 minutos para alcanzar RL=6-12 RU. Se sigue el anticuerpo de ensayo (o fragmento Fab) sobre la superficie del biosensor modificado en concentraciones variantes. Los anticuerpos de ensayo se diluyen en 0.001 M HEPES pH 7.4, 0.15 MnaCL, 3 mM EDTA, 0.005% tensoactivo P20 (HBS-EP)y todos lo experimentos se hicieron a 25°C. Las constantes de afinidad y cinéticos se determinan utilizando el software Biaevaluation (Biacore) con un modelo de interacción/ ajuste global 1:1. Como se muestra adelante en la Tabla 9 las uniones RX1 M-CSF con la más alta afinidad relacionada con otros anticuerpos se ensaya. El fragmento Fab del RX1 se une al M-SCF con significativamente afinidad relativa más baja mas baja a la holoproteína RX1.

Tabla 9

	Ka (M-1 Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
rRX1(ratón)	2.34e5	2.35e-4	1.0
rRX1 Fab (ratón)	2.81e5	3.03e-3	10.8
5H4	1.27e5	1.26e-3	9.9
5H4 Fab	2.04e5	2.85e-3	14.0

Los datos de neutralización y afinidad de unión indican que la actividad de neutralización del RX1 se debe primariamente a su alta y destacada afinidad para el M-CSF, y que esta alta afinidad se puede deber al menos en parte a la capacidad de ambos brazos del anticuerpo para unir el dímero M-CSF □simultáneamente.

413
413

EJEMPLO 12

Los siguientes ejemplos revelan el epítopo lineal (es decir, secuencia de aminoácido) sobre el M-CSF reconocido por los anticuerpos RX1, 5H4, y MC3.

Inicialmente, la estrategia de mapeo del epítopo se diseña para determinar si los anticuerpos RX1, 5H4, y MC3 reconocen epítopos lineales o epítopos conformacionales dentro del M-CSF. De acuerdo con esto, se ensayan anticuerpos anti-M-CSF contra 0.1 µg M-CSF bajo condiciones de reducción así como también con visiones de no reducción. Solo la forma no reducida del M-CSF se reconoce para cada uno de los anticuerpos, sugiriendo que los epítopos reconocidos son discontinuos en naturaleza. Luego, el epítopo lineal del M-CSF se determina para cada anticuerpo. Específicamente, las membranas SPOT (Sigma Genosys) se prepara si la secuencia de fragmento M-CSF de interés, traslapa péptidos 10mero sintetizados con un aminoácido, se carga en el soporte de membrana de celulosa. Estas membranas se sondean con los anticuerpos mencionados anteriormente y se identifica el SPOT reactivo. La secuencia de péptido se identifica luego por su ubicación correspondiente sobre la membrana, y traslapar los aminoácidos dentro de los péptidos de reacción positivos se identifican como el epítopo. Como se muestra en la Figura 18, el RX1 se une a un epítopo lineal diferente al 5H4 y MC3, que

mapean a una ubicación diferente en el M-CSF. El RX1 se une a un epítopo lineal, representado por RFRDNTPN (ID de SEC NO: 120) o RFRDNTAN (ID de SEC NO: 121), los aminoácidos 98-105 del M-CSF de la Figura 2. El 5H4 se une a un epítopo lineal representado por ITFEFVDQE (ID de SEC NO: 122), aminoácidos 65-73 del M-CSF de la Figura 12. El MC3 se une a dos epítopos lineales representados por (1) ITFEFVDQE (ID de SEC NO: 122) aminoácido 65-73 del M-CSF de la Figura 12 y (2) FYETPLQ (ID de SEC NO: 123), aminoácidos 138-144 del M-CSF de la figura 12.

EJEMPLO 13

La afinidad de unión de las versiones Human Engineered™ de los anticuerpos RX1 preparados como se describió anteriormente en el Ejemplo 4A se determina. Este ejemplo muestra que los anticuerpos Human Engineered™ RX1 con diferentes regiones constantes de subclase IgG se unen al M-CSF con diferentes afinidades *in vitro*. Para determinar las diferencias relativas en la afinidad de unión de los anticuerpos intactos por análisis Biacore, el M-CSF se inmoviliza en el chip biosensor CM5 por vía de amina de acoplamiento. 0.05 µg/ml de M-CSF en 10 mM de Na- ACETATO pH 4.0 se inyecta en 1 µl/min durante 5 minutos para alcanzar RL=6-12 RU. El anticuerpo de ensayo para los fragmentos Fab se sigue sobre una superficie de biosensor modificado en concentraciones que varían de 100 nM a 1.5 nM en diluciones

2- dobles. Los anticuerpos de ensayo se diluyen en 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M CaCL, 3 mM EDTA, 0.005% tensoactivo P20 (HBS-EP) y todos los experimentos se hacen a 25°C. Cada punto de concentración y blancos de amortiguación se corrieron por triplicado, y los datos se recolectan durante 3 minutos de asociación y 8 minutos de disociación. Las constantes de afinidad y cinéticas se determinan utilizando software de Biaevaluation con un modelo de interacción/ ajuste global 1:1. Como se muestra en la Tabla 10 adelante, el heRX1-1.G1 y heRX1-1.G4 se unen al M-CSF con afinidades que semejan más cercanamente la afinidad de unión RX1-M-CSF de murino.

Tabla 10

Anticuerpo	***ka (M-1 sec-1)***	***kd (sec -1)***	***KD (nM)***
Murino RX1 n=21	(2.23 ± 0.35) X 10^5	(1.56 ± 0.67) X 10^{-4}	0.7 ± 0.27
heRX1-1.G2 n=5	(2.36 ± 0.18) X 10^5	(1.37 ± 0.24) X 10^{-3}	5.9 ± 1.4
heRX1-10.G2 n=2	(1.73 ± 0.29) X 10^5	(1.1 ± 0.11) X 10^{-3}	6.3 ± 1.7
heRX1-1.G1	2.50 X 10^5	2.38 X 10^{-4}	0.95
heRX1-1.G4	2.07 X 10^5	2.93 X 10^{-4}	1.42

En contraste, como se muestra en la Tabla 11 adelante, aunque existe alguna variación en la afinidad de unión, todas las construcciones Gama-2 exhibieron al meno reducción de 7 veces en la afinidad de unión comparado con el anticuerpo de murino pariente.

Tabla 11

Anticuerpo	*ka (M-1 sec-1)*	*kd (sec -1)*	*KD (nM)*
Murino RX1 n=21	(2.23 ± 0.35) X 10^5	(1.56 ± 0.67) X 10^{-4}	0.7 ± 0.27
heRX1-1.G2 n=5	(2.36 ± 0.18) X 10^5	(1.37 ± 0.24) X 10^{-3}	5.9 ± 1.4
heRX1-2.G2	2.18 X 10^5	1.65 X 10^{-3}	7.6
heRX1-3.G2	2.01 X 10^5	1.18 X 10^{-3}	5.9
heRX1-4.G2	2.38 X 10^5	1.08 X 10^{-3}	4.6
heRX1-5.G2	1.75 X 10^5	1.29 X 10^{-3}	7.4
heRX1-6.G2	1.88 C 10^5	1.49 X 10^{-3}	7.9
heRX1-7.G2	1.57 X 10^5	1.49 X 10^{-3}	9.5
heRX1-8.G2	1.52 X 10^5	1.48 X 10^{-3}	9.8
heRX1-9.G2	2 X 10^5	1.44 X 10^{-3}	7.2
heRX1-10.G2 n=2	(1.73 ± 0.29) X 10^5	(1.1 ± 0.11) X 10^{-3}	6.3 ± 1.7

EJEMPLO 14

Este ejemplo muestra que los anticuerpos Human Engineered™ RX1 con diferentes regiones constantes de subclase IgG poseen diferentes actividades de neutralización *in vitro*. Para probar la actividad de neutralización de los anticuerpos M-CSF, un ensayo de proliferación de la línea celular M-NFS-60 se utiliza (American Type Culture Collection, No. de Acceso CRL-1838, disponible de ATCC en Rockville, MD, USA, derivado de leucemia mielógena inducida con el retrovirus ecotrópico de ratón salvaje Cas-Br.MuLV. La línea celular responde a la interleuquina 3 y al M-CSF y

contiene un proto-oncogen c-myb truncado por la integración de un retrovirus). La proliferación de M-NFS-60 requiere M-CSF activo en una forma dependiente de dosis. En el ensayo, las células M-NFS-60 se lavan y se colocan en placas en medio PRIM1640 con 10% FBS y 1% Pen/Strep. M-CSF humano recombinante (a concentración final de 10 ng/ml, que es equivalente a 3000 U/ml de actividad M-CSF), se incuba con varias concentraciones de anticuerpos que varían de 1 ug/ml a 0.5 ng/ml (en series de dilución de 2 veces) durante 1 hora a 37°C en 5% de CO_2 en un incubador. Luego de la incubación, la mezcla se agrega a cultivo M-NFS-60 en placas de microtítulo de 96 pozos. El volumen de ensayo total por pozo fue de 100 ul, con 10 ng/ml de M-CSF, y se indica la concentración de anticuerpo. Las células se incuban a 37°C bajo 5% de CO_2 durante 72 horas antes de que se cuantifiquen los números de células mediante ensayo CellTiter Glo (Promega). Cada anticuerpo se ensaya por triplicado, con una repetición al siguiente día (durante un total de seis ensayos por anticuerpo). El IC_5 para cada anticuerpo se analiza mediante ajuste de curva.

El ensayo se repite utilizando MCSF en suero, medio condicionado MDA231 (que contiene M-CSF), MCSF de mono cinomólogo en suero, y MCSF recombinante de mono cinomólogo. Los resultados se presentan en la Figuras 25 (MCSF recombinante), 26 (MCSF humano en suero) y 27 (medio condicionado MDA231) como la lectura fluorescente del ensayo

DellTiter Glo, que es lineal con números de células. La actividad neutralizante de los anticuerpos se muestra como una inhibición de la proliferación de células M-NFS-60.

Los resultados muestran que el IC50 del heRX1-1-IgG1 y el heRX1-1-IgG4 son aproximadamente los mismos como el anticuerpo RX1 pariente de murino recombinante, mientras que el IC50 del heRX1-1-IgG2 es de aproximadamente 2 veces a 4 veces mayor.

La Tabla 12 muestra el IC50 relativo (en términos de pérdida de IC50) de varias construcciones IgG2 preparadas como se describió anteriormente en el Ejemplo 4A. De estas construcciones, el heRX1-1.G2 y heRX1-10.G2 muestra la pérdida de reducción en Ic50.

Tabla 12.

Anticuerpo	**Pérdida de IC50**
heRX1-1.G2	**2.8x**
heRX1-2.G2	**3.1x**
heRX1-3.G2	**5.3x**
heRX1-4.G2	**4.6x**
heRX1-5.G2	**6.5x**
heRX1-6.G2	**5.9x**
heRX1-7.G2	**6.1x**
heRX1-8.G2	**5.9x**
heRX1-9.G2	**3.6x**

heRX1-10.G2	**2.2x**
heRX1-1.G1	**Sin pérdida**
heRX1-1.G4	**Sin pérdida**
heRX1-10.G1	**Sin pérdida**
heRX1-10.G4	**Sin pérdida**

EJEMPLO 15

Este ejemplo muestra que los anticuerpos RX1 Human Engineered™ con diferentes regiones constantes de su clase IgG poseen diferentes actividades TRAP en un ensayo de osteoclastogénesis *in vitro*.

Las células CD34+ de médula de hueso humana (Número de catalogo Biowhittaker 2M-101ª, 3x 10^5 células/ frasco) se inducen para diferenciar en osteoclastos bajo condiciones experimentales descritas aquí. En el día 1, las células CD34+ se descongelan a partir de un frasco congelado en 10 ml de medio (Alfa MEM con 10% FCS, 1 x Pen Strep y 1x de fungizona). Las células se lavan una vez y se resuspenden en 2 ml de medio y se colocan en una placa de 96 pozos en 100 ul por pozo. En el día 2, sin remover el medio original, 50 ul de 4x CSF-1 a 30 ng/ml de concentración final y 50 ul de 4x RANKL (sRANKL, Chemicon catalog # GF091, 10 ug/ paquete) a concentración final de 100 ng/ml se agrega a cada pozo. En el día 7, 50 ul de 5x RANKL a concentración final de 100 ng/ml se agrega a cada pozo. En el día 17, las células se tiñen para actividad TRAP (Kit Leukocyte Acid Phosphatase para

teñido TRAP, Sigma catalog # 387-A) y se examina bajo el microscopio.

Los anticuerpos neutralizantes M-CSF se agregan en el día 2 del ensayo. Los anticuerpos inhiben la diferenciación de osteoclastos en una forma dependiente de la dosis como se muestra en la Figura 28. La actividad inhibidora de los anticuerpos en el ensayo de diferenciación de osteoclasto se muestra como falta de osteoclastos visibles en el día 17 del ensayo.

EJEMPLO 16

Los anticuerpos RX11 Human Engineered™ con diferentes regiones constantes de subclase IgG se caracterizan adicionalmente. Los complejos de anticuerpo de antígeno que los varios anticuerpos RX1 Human Engineered™ forman con el MCSF se estudiaron al combinar el M-CSF y el anticuerpo en amortiguador a proporciones molares iguales, seguidas por análisis del tamaño del complejo de anticuerpo antígeno utilizando cromatografía de exclusión de tamaño o dispersión de luz. Los resultados mostraron que el RX1 pariente de murino parece formar complejo 1:1 con MCSF de aproximadamente 200 kDa. Los anticuerpos heRX1-9.G2 o 1-10.G2 parecen formar complejos 2:1 o 2:2 con MCSF de aproximadamente 400 kDa. El heRX1-1.G2 para formar agregados de red grande con MCSF mayor de 2 X 10^6 Da. Las construcciones IgG1 e IgG4 forman

421

similares complejos pequeños a aquellos del RX1 pariente de murino.

Desnaturalizar la reducción y no reducción del SDS-PAGE del heRX1-1.G4 mostró la versión IgG4 que parece formar la mitad de los anticuerpos, como se espera.

Todas las patentes estadounidenses, publicaciones de solicitud de patente estadounidenses, solicitudes de patente estadounidenses, patentes anteriores, solicitudes de patentes anteriores y publicaciones no patentes referidas a esta especificación y/o listadas en la Hoja de Datos de Solicitud, se incorpora aquí como referencia, en su totalidad.

Se apreciará a partir de lo anterior que, aunque modalidades específicas de la invención se han descrito aquí para propósitos de ilustración, se pueden hacer varias modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

4/22

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de no murino que compite con un anticuerpo monoclonal RX1 para unir al M-CSF por más del 75%, en donde dicho anticuerpo monoclonal RX1 comprende las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena liviana establecidas en las ID de SEC Nos: 2 y 4, respectivamente.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que se une específicamente al mismo epítopo de M-CSF como un anticuerpo monoclonal RX1, en donde dicho anticuerpo monoclonal RX1 comprende las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena liviana establecidas en la ID de SEC Nos: 2 y 4, respectivamente.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2 que une un epítopo de M-CSF que comprende al menos 4 residuos contiguos de las ID de SEC No: 120 o 121.

4. El anticuerpo de la reivindicación 2 que une un epítopo de M-CSF que comprende las ID de SEC No: 120 o 121.

5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es un anticuerpo monoclonal.

6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de ingeniería humana, un anticuerpo humano, o un anticuerpo de cadena sencilla.

7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que es un anticuerpo IgG.

8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es un fragmento FaB, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv, o un fragmento Fv de cadena sencilla.

9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que retiene una afinidad Kd (constante de equilibrio de disociación) con respecto a la M-CSF de la ID de SEC No: 9 de al menos 10^{-7} M o mayor.

10. El anticuerpo de la reivindicación 9 que retiene una afinidad Kd con respecto a la M-CSF de la ID de SEC No: 9 de al menos 10^{-8} M o mayor.

11. El anticuerpo de la reivindicación 10 que retiene una afinidad Kd Kd con respecto a la M-CSF de la ID de SEC No: 9 de al menos 10^{-9} M o mayor.

424

12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende una secuencia de aminoácido 90% idéntica a la ID de SEC No: 24.

13. El anticuerpo de la reivindicación 11 que comprende la ID de SEC No: 24.

14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos 1 de las ID de SEC Nos: 18, 21, 24, 29, 32, y 36.

15. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos 2 de las ID de SEC Nos: 18,21, 24, 29, 32, y 36.

16. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos 3 de las ID de SEC Nos: 18, 21, 24, 29, 32, y 36.

17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos 4 de las ID de SEC Nos: 18, 21, 24, 29, 32, y 36.

18. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos 5 de las ID de SEC Nos: 18, 21, 24, 29, 32, y 36.

425

19. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende todas las ID de SEC Nos: 18, 21, 24, 29, 32, y 36.

20. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-18 que comprende adicionalmente una o más de las ID de SEC Nos: 16, 19, 22, 27, 30, y 34.

21. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-18 que comprende adicionalmente una o más de las ID de SEC Nos: 17, 20, 23, 28, 31, y 35.

22. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-18 que comprende adicionalmente una o más de las ID de SEC Nos: 18, 21, 25, 29, 32, y 37.

23. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-18 que comprende adicionalmente uno o más consenso CDR establecidos en la ID de SEC Nos: 18, 21, 26, 29, 33, y 38.

24. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-23 en el cual al menos un aminoácido dentro de un CDR es sustituido por un residuo correspondiente de un CDR correspondiente de otro anticuerpo anti-MCSF.

426

25. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-24 que comprende una secuencia de aminoácido de cadena liviana variable que es al menos 65% homóloga a la secuencia de aminoácido establecida en la ID de SEC No : 4.

26. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11-25 que comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada variable que es al menos 65% homóloga a la secuencia de aminoácido establecida en la ID de SEC No: 2.

27. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-26 que comprende una región constante de secuencia de anticuerpo humano y una o más regiones de estructura variable de cadena liviana y pesada secuencia de anticuerpo humano.

28. El anticuerpo de la reivindicación 27 en donde la secuencia de anticuerpo humano es una secuencia humana individual, una secuencia consenso humana, una secuencia de línea germinal humana individual, o una secuencia de línea germinal consenso humana.

29. El anticuerpo de la reivindicación 27 que comprende un fragmento de una región constante IgG1.

427

30. El anticuerpo de la reivindicación 29 que comprende una mutación en la región constante IgG1 que reduce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o la actividad citotóxica dependiente de complemento.

31. El anticuerpo de la reivindicación 27 que comprende un fragmento de una región constante IgG4.

32. El anticuerpo de la reivindicación 31 que comprende una mutación en la región constante IgG4 que reduce la formación de mitades de anticuerpo.

33. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido XVXLXEXGXXXXXXXXXLXLXCXVXDYSITSDYAWNWIXQXXXXXLXWMGYISYSG STSXNXXLXXXIXIXRXXXXXXFXLXLXXVXXXDXAXYYCASFDYAHAMDYWGXGT XVXVXX, en donde X es cualquier aminoácido.

34. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido DVXLXEXGPXXVXPXXXLXLXCXVTDYSITSDYAWNWIRQXPXXKLEWMGYISYSG STSYNPSLKXRIXIXRXTXXNXFXLXLXXVXXXDXATYYCASFDYAHAMDYWGXGT XVXVXX, en donde X es cualquier aminoácido.

35. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido XVQLQESGPGLVKPSQXLSLTCTVXDYSITSDYAWNWIRQFPGXXLEWMGYISYSG STSYNPSLKSRIXIXRDTSKNQFXLQLNSVTXXDTAXYYCASFDYAHAMDYWGQGT XVTVSS, en donde X es cualquier aminoácido.

36. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido DVQLQESGPGLVKPSQXLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGXKLEWMGYISYSG STSYNPSLKSRIXIXRDTSKNQFXLQLNSVTXXDTATYYCASFDYAHAMDYWGQGT XVTVSS, en donde X es cualquier aminoácido.

37. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSG STSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGT TV TV SS.

38. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSG

479

STSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGT

TVTV

SS.

39. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido XIXLXQXXXXXXVXXXXXVXFXCXAXQSIGTSIHWYXQXXXXXPXLLIKYASEXXX XIXXXFXGXGXGXXFXLXIXXVXXXDXADYYCQQINSWPTTFGXGTXLXXXXX, en donde X es cualquier aminoácido.

40. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido XIXLXQXPXXLXVXPXXXVXFXCXASQSIGTSIHWYQQXTXXSPRLLIKYASEXIS XIPXRFXGXGXGXXFXLXIXXVXXXDXADYYCQQINSWPTTFGXGTXLXXXXX, en donde X es cualquier aminoácido.

41. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido XIXLTQSPXXLSVSPGERVXFSCRASQSIGTSIHWYQQXTXXXPRLLIKYASEXXX GIPXRFSGSGSGTDFTLXIXXVESEDXADYYCQQINSWPTTFGXGTKLEIKRX, en donde X es cualquier aminoácido.

42. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana

430

que comprende la secuencia de aminoácido XIXLTQSPXXLSVSPGERVXFSCRASQSIGTSIHWYQQXTXXSPRLLIKYASEXIS GIPXRFSGSGSGTDFTLXIXXVESEDXADYYCQQINSWPTTFGXGTKLEIKRX, en donde X es cualquier aminoácido.

43. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido XIXLTQSPXXLSVSPGERVXFSCRASQSIGTSIHWYQQXTXXXPRLLIKYASESIS GIPXRFSGSGSGTDFTLXIXXVESEDXADYYCQQINSWPTTFGXGTKLEIKRX, en donde X es cualquier aminoácido.

44. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASESIS GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT.

45. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASERAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT.

46. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32, que comprende una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácido

437

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASERIS GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT.

47. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 33-46 en donde al menos un X es el mismo aminoácido en la misma posición correspondiente en las ID de SEC Nos: 2 o 4 utilizando numeración Kabat.

48. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 33-46, en donde al menos un X es una sustitución conservadora de un aminoácido en la misma posición correspondiente en las ID de SEC Nos: 2 o 4 utilizando numeración Kabat.

49. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 33-46, en donde al menos un X es una sustitución no conservadora de un aminoácido en la misma posición correspondiente en la ID de SEC Nos: 2 o 4 utilizando numeración Kabat.

50. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 33-46, en donde al menos un X es un aminoácido en la misma posición correspondiente dentro de una secuencia de anticuerpo humano, utilizando numeración Kabat.

51. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 33-46, en donde al menos un X es un aminoácido en la misma

posición correspondiente dentro una secuencia de anticuerpo consenso humana, utilizando numeración Kabat.

52. El anticuerpo de la reivindicación 50 en donde la secuencia de anticuerpo humano es una secuencia consenso humana, una secuencia de línea germinal humana, una secuencia de línea germinal consenso humana, o una cualquiera de las secuencias de anticuerpo humanas en Kabat.

53. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32 comprende una cualquiera de las secuencias de cadena pesada establecidas en las ID de SEC Nos: 114, 116, o 119.

54. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32 comprende una cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada establecidas en las ID de SEC Nos: 41 o 43.

55. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-32 comprende una cualquiera de las secuencias de cadena liviana establecidas en las ID de SEC Nos: 45, 47, 48, 51, 53 o 136.

56. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende la secuencia de cadena pesada establecida en la ID de SEC

No: 114 y la secuencia de cadena liviana establecida en la ID de SEC No: 47.

57. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende la secuencia de cadena pesada establecida en la ID de SEC No: 116 y la secuencia de cadena liviana establecida en la ID de SEC No: 47.

58. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende la secuencia de cadena pesada establecida en la ID de SEC No: 119 y la secuencia de cadena liviana establecida en la ID de SEC No: 47.

59. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 33-46 comprende una secuencia de aminoácido de cadena variable pesada que es al menos 65% idéntica a la secuencia de aminoácido de cadena pesada variable establecida en la ID de SEC Nos: 41 o 43.

60. El anticuerpo de la reivindicación 59 comprende una secuencia de aminoácido de cadena variable pesada que es al menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácido de cadena pesada variable establecida en la ID de SEC Nos: 41 o 43.

61. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 33-46 comprende una secuencia de aminoácido de cadena

variable liviana que es al menos 65% idéntica a la secuencia de aminoácido de cadena liviana variable establecida en las ID de SEC Nos: 45, 47, 48, 51, o 53.

62. El anticuerpo de la reivindicación 61 comprende una secuencia de aminoácido de cadena variable liviana que es al menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácido de cadena liviana variable establecida en las ID de SEC Nos: 45, 47, 48, 51, o 53.

63. Un anticuerpo que comprende una cadena pesada como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 33-38, 53 o 59-60 y una cadena liviana como se establece en una cualquiera de las reivindicaciones 39-46, 54 o 61-62.

64. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 12-63 que tiene una afinidad Kd de al menos 10^{-7}.

65. El anticuerpo de la reivindicación 64 que tiene una afinidad Kd de al menos 10^{-9}.

66. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena liviana del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-65.

67. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 66 que comprende una secuencia de ácido nucleico de cadena pesada que es al menos 65% idéntica a la secuencia de nucleótido de cadena pesada establecida en la ID de SEC No: 1 o ID de SEC Nos: 40 o 42.

68. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 67 que comprende una secuencia de ácido nucleico de cadena pesada que es al menos 80% idéntica a la secuencia de nucleótido de cadena pesada establecida en la ID de SEC No: 1 o ID de SEC Nos: 40 o 42.

69. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 66 que comprende una secuencia de ácido nucleico de cadena liviana que es al menos 65% idéntica a la secuencia de nucleótido de cadena liviana establecida en la ID de SEC No: 3 o las ID de SEC Nos: 44, 46, 52, 135, o 137.

70. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 69 que comprende una secuencia de ácido nucleico de cadena liviana que es al menos 80% idéntica a la secuencia de nucleótido de cadena liviana establecida en la ID de SEC No: 3 o ID de SEC Nos: 44, 46, 52, 135, o 137.

71. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 66 - 70.

436

72. El vector de la reivindicación 71, en donde el ácido nucleico aislado está operablemente ligado a una secuencia de control regulador.

73. Una célula huésped comprende el vector de la reivindicación 72 o el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 66-70.

74. Un método para producir un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-65 que comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 73 tal que el ácido nucleico aislado se expresa para producir el anticuerpo.

75. El método de la reivindicación 74, que comprende adicionalmente la etapa de recuperar el anticuerpo del cultivo de célula huésped.

76. Un anticuerpo aislado producido por el método de la reivindicación 75.

77. Un hibridoma o célula huésped que secreta un anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

78. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-65 o 76 que se conjuga para una toxina.

437

79. Una composición farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos de las reivindicaciones 1-65 o 76, y un vehículo farmacéuticamente adecuado, excipiente o diluyente.

80. La composición farmacéutica de la reivindicación 79 que comprende adicionalmente un segundo agente terapéutico.

81. La composición farmacéutica de la reivindicación 80 en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer.

82. La composición farmacéutica de la reivindicación 80 en donde el segundo agente terapéutico es un bisfosfonato.

83. La composición farmacéutica de la reivindicación 82 en donde el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato.

84. La composición farmacéutica de la reivindicación 80 en donde el segundo agente terapéutico es otro anticuerpo.

85. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-41 o 50 que se une al M-CSF para evitar que un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis en donde dicho anticuerpo reduce

438

efectivamente la severidad de la pérdida de hueso asociada con la enfermedad.

86. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-65 o 76 que se une al M-CSF para tratar a un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis en donde dicho anticuerpo reduce efectivamente la severidad de la pérdida de hueso asociada con la enfermedad

87. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 86 en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociadas con actividad de osteoclasto relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (que incluye hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (incluyendo raquitismo/osteomalacia, escorbuto, mal nutrición), enfermedades crónicas (incluyendo síndromes de mala absorción, falla renal crónica (incluyendo osteodistrofia renal), enfermedad crónica del hígado (incluyendo osteodistrofia hepática), drogas (incluyendo glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (incluyendo osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis,

inflamación del hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Pager.

88. El anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1-65 o 76 que se une al M-CSF para evitar o tratar la metástasis de cáncer al hueso, en donde el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, que incluyen cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto biliar o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, o cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer de cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; o cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

89. Un método para prevenir o reducir la pérdida de hueso que comprende administrar a un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de

440

una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76, en una cantidad efectiva para prevenir o reducir pérdida de hueso asociada con la enfermedad.

90. Un método para tratar un sujeto afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76, en una cantidad efectiva para reducir la severidad de pérdida de hueso asociada con la enfermedad.

91. El método de la reivindicación 89 o 90 en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociadas con actividad de osteoclasto relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (que incluye hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (incluyendo raquitismo/osteomalacia, escorbuto, mal nutrición), enfermedades crónicas (incluyendo síndromes de mala absorción, falla renal crónica (incluyendo osteodistrofia renal), enfermedad crónica del hígado (incluyendo osteodistrofia hepática), drogas (incluyendo glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (incluyendo osteogénesis

imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación del hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Pager.

92. Un método para prevenir o tratar cáncer metastásico al hueso, que comprende administrar a un sujeto afligido con cáncer metastásico una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-65 0 76.

93. El método de la reivindicación 92 en donde el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, que incluyen cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto biliar o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, y cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer de cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

142

94. Un método para el tratamiento del cáncer que comprende administrar a un sujeto en necesidad de este, cantidades terapéuticamente efectivas de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-65 o 76.

95. El método de cualquiera de las reivindicaciones 89-94 que comprende adicionalmente administrar un segundo agente terapéutico.

96. El método de la reivindicación 95 en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer.

97. El método de la reivindicación 95 en donde el segundo agente terapéutico es un factor de estimulación de colonia no M-CSF, o anticuerpo anti-RANKL, o receptor RANKL soluble.

98. El método de la reivindicación 95 en donde el segundo agente terapéutico es un bisfosfonato.

99. El método de la reivindicación 98 en donde el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato.

100. El método de 98 o 99 en donde se imposibilita al sujeto de recibir tratamiento de bifosfonato.

101. El método de cualquiera de las reivindicaciones 95-100 en donde el anticuerpo es efectivo para reducir la dosis del segundo agente terapéutico para alcanzar un efecto terapéutico.

102. El método de cualquiera de las reivindicaciones 89-101 en donde dicho sujeto es un mamífero.

103. El método de cualquiera de las reivindicaciones 89-101 en donde dicho anticuerpo se administra en una cantidad efectiva para inhibir la proliferación de osteoclastos y/o la diferenciación inducida por células de tumor.

104. El método de cualquiera de las reivindicaciones 89-103 en donde el anticuerpo se administra en una dosis entre aproximadamente 2 µg/kg a 30 mg/kg de peso corporal.

105. El método de la reivindicación 104 en donde el anticuerpo se administra en una dosis entre aproximadamente 0.1 mg/kg a 30 mg/kg de peso corporal.

106. El método de la reivindicación 105 en donde el anticuerpo se administra en una dosis entre aproximadamente 0.1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

107. El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76 en la fabricación de un medicamento para prevenir o reducir la pérdida de hueso en un paciente que exhibe osteólisis.

108. El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76 en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis.

109. El uso de la reivindicación 108 en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociadas con actividad de osteoclasto relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (que incluye hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (incluyendo raquitismo/osteomalacia, escorbuto, mal nutrición), enfermedades crónicas (incluyendo síndromes de mala absorción, falla renal crónica (incluyendo osteodistrofia renal), enfermedad crónica del hígado (incluyendo osteodistrofia hepática), drogas (incluyendo glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (incluyendo osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis,

osteopetrosis, inflamación del hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Pager.

110. El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76 en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar cáncer que hace metástasis al hueso en un paciente que sufre de cáncer que hace metástasis.

111. El uso de la reivindicación 110 en donde el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, que incluyen cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del colon, cáncer intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto biliar o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, y cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer de cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

112. El uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 A 65 o 76 en la fabricación de un medicamento para tratar un paciente que tiene cáncer.

113. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 107-112 en donde dicho medicamento se coordina con un tratamiento que utiliza un segundo agente terapéutico.

114. El uso de la reivindicación 113 en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer.

115. El uso de la reivindicación 113 en donde el segundo agente terapéutico es un factor de estimulación de colonia no M-CSF, o anticuerpo anti-RANKL, o receptor RANKL soluble.

116. El uso de la reivindicación 113 en donde el segundo agente terapéutico es un bisfosfonato.

117. El uso de la reivindicación 116 en donde el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato.

118. El uso de la reivindicación 116 o 117 en donde se imposibilita al paciente para recibir el tratamiento de bifosfonato.

4417

119. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 107-112 en donde dicho paciente ha sido pre-tratado con el segundo agente terapéutico.

120. El uso de la reivindicación 119 en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer.

121. El uso de la reivindicación 119 en donde el segundo agente terapéutico es un factor de estimulación de colonia no M-CSF, o anticuerpo anti-RANKL, o receptor RANKL soluble.

122. El uso de la reivindicación 119 en donde el segundo agente terapéutico es un bisfosfonato.

123. El uso de la reivindicación 122 en donde el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato.

124. El uso de la reivindicación 122 o 123 en donde se imposibilita al paciente para recibir el tratamiento de bifosfonato.

125. El uso de una combinación sinergística del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76 para

la preparación de un medicamento para tratar un paciente que exhibe osteólisis en donde dicho medicamento se coordina con un tratamiento que utiliza un segundo agente terapéutico.

126. El uso de la reivindicación 125 en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer.

127. El uso de la reivindicación 125 en donde el segundo agente terapéutico es un factor de estimulación de colonia no M-CSF, o anticuerpo anti-RANKL, o receptor RANKL soluble.

128. El uso de la reivindicación 125 en donde el segundo agente terapéutico es un bisfosfonato.

129. El uso de la reivindicación 125 en donde el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato.

130. El uso de la reivindicación 128 o 129 en donde se imposibilita al paciente para recibir el tratamiento de bifosfonato.

131. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 113-130 en donde la cantidad de anticuerpo en el medicamento es una

450

contenedor, la etiqueta describe el contenido del contenedor y suministra indicaciones y/o instrucciones relacionadas con el uso de los contenidos del contenedor para prevenir o reducir la pérdida de hueso.

137. Un kit que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76, empacada en un contenedor, tal como una botella o frasco, y que comprende adicionalmente una etiqueta unida a o empacada con el contenedor, la etiqueta describe el contenido del contenedor y suministra indicaciones y/o instrucciones relacionadas con el uso de los contenidos del contenedor a un paciente afligido con una enfermedad que origina o contribuya con la osteólisis.

138. El kit de la reivindicación 137 en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste de enfermedades metabólicas de hueso asociadas con actividad de osteoclasto relativamente incrementada, que incluye endocrinopatías (que incluye hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatiroidismo primario o secundario, hipertiroidismo), hipercalcemia, estados de deficiencia (incluyendo raquitismo/osteomalacia, escorbuto, mal nutrición), enfermedades crónicas (incluyendo síndromes de mala absorción, falla renal crónica (incluyendo osteodistrofia renal), enfermedad

451

crónica del hígado (incluyendo osteodistrofia hepática), drogas (incluyendo glucocorticoides (osteoporosis inducida por glucocorticoides), heparina, alcohol), y enfermedades hereditarias (incluyendo osteogénesis imperfecta, homocistinuria), cáncer, osteoporosis, osteopetrosis, inflamación del hueso asociada con artritis y artritis reumatoide, enfermedad periodontal, displasia fibrosa, y/o enfermedad de Pager.

139. Un kit que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 A 65 o 76, empacada en un contenedor, tal como una botella o frasco, y que comprende adicionalmente una etiqueta unida a o empacada con el contenedor, la etiqueta describe el contenido del contenedor y suministra indicaciones y/o instrucciones relacionadas con el uso de los contenidos del contenedor para prevenir o tratar cáncer que hace metástasis al hueso.

140. El kit de la reivindicación 139 en donde el cáncer metastásico es cáncer de mama, pulmón, renal, mieloma múltiple, tiroides, próstata, adenocarcinoma, malignidades de células sanguíneas, que incluye leucemia y linfoma; cánceres de cabeza y cuello; cánceres gastrointestinales, que incluyen cáncer del esófago, cáncer del estómago, cáncer del colon, cáncer

452

intestinal, cáncer colorectal, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer del hígado, cáncer del conducto biliar o vesícula biliar; malignidades del tracto genital femenino, que incluye carcinoma del ovario, cáncer endometrial del útero, cáncer vaginal, y cáncer cervical; cáncer de la vejiga; cáncer de cerebro, que incluye neuroblastoma; sarcoma, osteosarcoma; y cáncer de piel, que incluye melanoma maligno o cáncer de célula escamosa.

141. Un kit que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65 o 76, empacada en un contenedor, tal como una botella o frasco, y que comprende adicionalmente una etiqueta unida a o empacada con el contenedor, la etiqueta describe el contenido del contenedor y suministra indicaciones y/o instrucciones relacionadas con el uso de los contenidos del contenedor para tratar cáncer.

142. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 136-141 que comprende adicionalmente un segundo agente terapéutico.

143. El kit de la reivindicación 142 en donde el segundo agente terapéutico es un agente quimioterapéutico contra el cáncer.

453

144. El kit de la reivindicación 142 en donde el segundo agente terapéutico es un factor de estimulación de colonia no M-CSF, o anticuerpo anti-RANKL, o receptor RANKL soluble.

145. El kit de la reivindicación 142 en donde el segundo agente terapéutico es un bisfosfonato.

146. El kit de la reivindicación 145 en donde el bisfonato es zeledronato, pamidronato, clodronato, etidronato, tilundronato, alendronato, o ibandronato.

147. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 136-146 incluye instrucciones para tratar un paciente imposibilitado para recibir tratamiento de bifosfonato.

148. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 136-147 que comprende una dosis de anticuerpo efectivo para reducir la dosificación del segundo agente terapéutico requerido para alcanzar un efecto terapéutico.

149. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 136-147 que comprende una dosis sinergística del anticuerpo.

150. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 136-147 que comprende una dosis de anticuerpo efectivo para inhibir

454

la proliferación de osteoclastos y/o la diferenciación inducida por células de tumor.

151. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 136-147 que comprende una dosis del anticuerpo entre aproximadamente 2 µg/kg a 30 mg/kg de peso corporal.

152. El kit de la reivindicación 151 que comprende una dosis del anticuerpo entre aproximadamente 0.1 mg/kg a 30 mg/kg de peso corporal.

153. El kit de la reivindicación 152 que comprende una dosis del anticuerpo entre aproximadamente 0. 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal.

154. Un método para seleccionar un anticuerpo M-CSF específico comprende las etapas de:

a) poner en contacto medio celular de tumor metastásico, osteoclastos y un anticuerpo candidato;

b) detectar la formación de osteoclastos, proliferación y/o diferenciación; y

c) identificar dicho anticuerpo candidato como un anticuerpo M-CSF específico si se detecta una reducción en la formación, proliferación y/o la diferenciación de osteoclastos.

425

155. El método de selección de acuerdo con la reivindicación 154 en donde dicho medio de células de tumos mestastásico incluye células de tumor.

156. El método de selección de acuerdo con la reivindicación 154 en donde la etapa de poner en contacto (a) ocurre in vivo, dicha etapa de detección (b) comprende detectar el tamaño y/o número de metástasis de hueso, y el anticuerpo candidato se identifica como un anticuerpo M-CSF específico si se detecta una disminución en el tamaño y/o número de metástasis de hueso.

157. El método de selección de acuerdo con la reivindicaciones 154-156 que comprende adicionalmente las etapas de determinar si el anticuerpo candidato se une al M-CSF.

158. El método de selección de acuerdo con la reivindicaciones 154-157 que comprende adicionalmente la etapa de determinar si dicho anticuerpo candidato inhibe la interacción entre M-CSF y su receptor M-CSFR.

159. Un método para identificar un anticuerpo M-CSF específico que puede prevenir o tratar cáncer que hace metástasis al hueso comprende las etapas de:

(a) detectar la unión de un anticuerpo candidato a un epítopo de M-CSF que incluye al menos 4 residuos contiguos de las ID de SEC Nos. 120 o 121; y

456

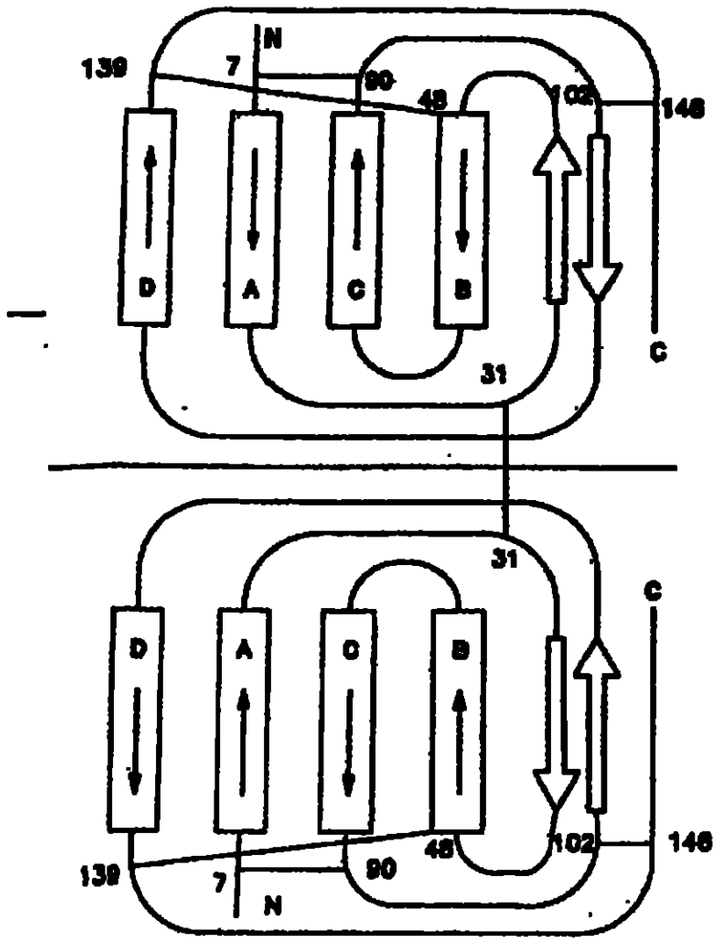
(b) ensayar la capacidad de dicho anticuerpo candidato para prevenir o tratar cáncer que hace metástasis al hueso *in vitro* o *in vivo*.

160. Se suministra un método para alterar sistemáticamente hasta el 60% de la secuencia de aminoácido de cadena pesada establecida en la ID de SEC No: 2 que comprende alterar cualquier X en la secuencia de aminoácido XVXLXEXGXXXXXXXXXLXLXCXVXDYSITSDYAWNWIXQXXXXXLXWMGYISYSG STSXNXXLXXXIXIXRXXXXXXFXLXLXXVXXXDXAXYYCASFDYAHAMDYWGXGT XVXVXX, y un anticuerpo de ensayo comprende alterar una secuencia de aminoácido para unirse a un epítopo de M-CSF que incluye al menos 4 aminoácidos contiguos de las ID de SEC Nos: 120 o 121.

161. Se suministra un método para alterar significativamente hasta el 60% de la secuencia de aminoácido de cadena liviana establecida en la ID de SEC No: 4 que comprende alterar cualquier X en la secuencia de aminoácido XIXLXQXXXXXXVXXXXXVXFXCXAXQSIGTSIHWYXQXXXXXPXLLIKYASEXXX XIXXXFXGXGXGXXFXLXIXXVXXXDXADYYCQQINSWPTTFGXGTXLXXXXX, y un anticuerpo de ensayo comprende alterar una secuencia de aminoácido para unirse a un epítopo de M-CSF que incluye al menos 4 aminoácidos contiguos de las ID de SEC Nos: 120 o 121.

457

FIG. 1



458

458

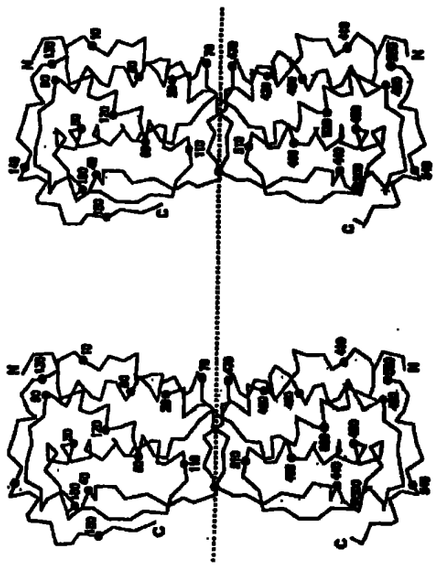


FIG. 2

FIG. 3

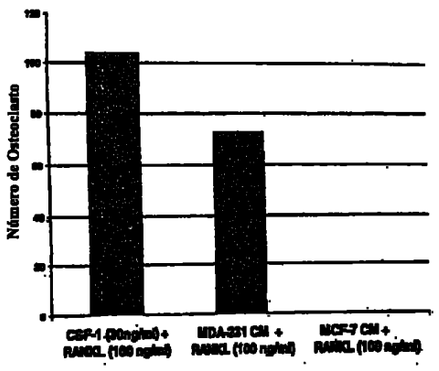

Número de Osteoclasto
CSF-1 (30ng/ml) + RANKL (100 ng/ml)
MDA-231 CM + RANKL (100 ng/ml)
MCF-7 CM + RANKL (100 ng/ml)

Fig. 4A

Secuencia de aminoácido de cadena liviana Rx1:

1 2 3

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINNWPTTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSE
QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

Secuencia de aminoácido de cadena pesada Rx1:

4 5 6

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVIGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARFDYARNGTWYQGTSVTVSSAKT
PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP
KIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTC
VTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG

Secuencia de nucleótidos de cadena pesada Rx1:

atgggttggtcctgtatcatcctattcctggtggccactgccacaggtgtgcactccgacgtgcagcttcaggagtcaggacctggcctcgtgaaaccttctcagagtctgtccctcacctgt
actgtcactgactactccatcaccagtgattacgcctggaactggatacggcaattcccagggcataaacttgagtggatggggtacataagctacagtggtagcactactcaatccatct
ctcaaaagtcggatctccatcactcgagacacatccaagaaccagttcttcctgcagctgaactctgtgactactgaggacacagccacatattactgtgcatcctttgactatgcccagcc
atggattactggggccaagggacttcggtcactgtctcttccgccaaaacaacagccccatcggtctatccactggcccctgtgtgtggagatacaactggctcctcggtgactctaggatgc
ctggtcaagggttatttcccctgagccagtgacctgaactggaactctggatccctgtccagtggtgtgcacacctcccagctgtcctgcagtctgacctctacaccctcagcagctcagtg
actgtaacctcgagcacctggcccagccagtccatcacctgcaatgtggcccaccggcaagcagcaccaggtggacaagaaaattgagcccagagggcccacaatcaagccctgtcctcca
tgcaaatgcccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtcttcatcttcccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgtgtggtggtggatgtgagc
gaggatgaccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacccatagaggaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgcctccccatc
cagcaccaggactggatgagtggcaaggagttcaaatgcaaggtcaacaacaaagacctcccagcgcccatcgagagaccattctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatat
gtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaac
tacaagaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactggtggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggt
ctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccggactccgggtaaa

Secuencia de nucleótidos de cadena liviana Rx1:

atggtatccacacctcagttccttgtatttttgtgtttctggattccagcctccagaggtgacatcttgctgactcagtctccagccatcctgtctgtgagtccaggagaaagagtcagtttc
tcctgcagggccagtcagagcattggcacaagcatacactggtatcagcaaagaacaaatggttctccaaggcttctcataaagtatgcttctgagtctatctctgggatcccttccaggttt
agtggcagtggatcagggacagatttactcttagcatcaacagtgtggagtctgaagatattgcagattactactgtcaacaaattaatagctggccaaccacgttcggcgggggacaaag
ttggaaataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttctgaacaacttctaccccaaagacatc
aatgtcaagtggaagattgatggcagtgaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgag
tatgaacgcatataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccacttgtcaagagcttcaacaggaatgagtgt

461

FIG. 4B

Evaluaciones del Riesgo de Cadena Liviana CHIR-RX1

Región-V	Aminiácidos 1-52
Riesgo	LHLHLHLMLLMLHLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHLMLLMHMHHHHHH
Ratón	DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS

Región-V	Aminiácidos 53-109
Riesgo	HLMMLHMLMHLHLHLHLHLHLHLLHLLLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLLLLLLL
Ratón	ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINNWPT------TFGGGTKLEI-KRA

FIG. 4B

Evaluaciones del Riesgo de Cadena Pesada CHIR-RX1

Región-V	Aminiácidos 1-57
Riesgo	MHLHLHLHMLLMLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHHHLMLLMGMHHHHHHHHHHHHH
Ratón	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMGYIS---YSGST

Región-V	Aminiácidos 58-113
Riesgo	HHHMHHMLMHLHLHLMLLMLHLHLHLLHLLLHLMHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLHLL
Ratón	SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASYDYAMAM----------DYWGQGTSVTVSS

FIG. 5A

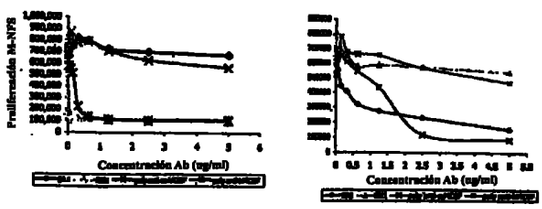
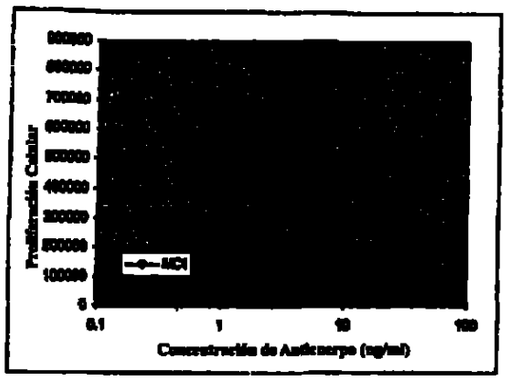
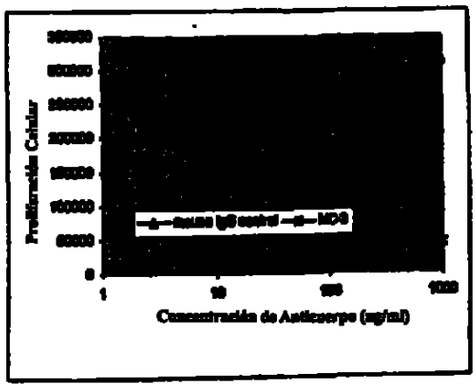

Proliferación H4-NP8
Concentración Ab (ug/ml)
Concentración Ab (ug/ml)

FIG. 5B

El MC1 Neutraliza la actividad MCSF humana

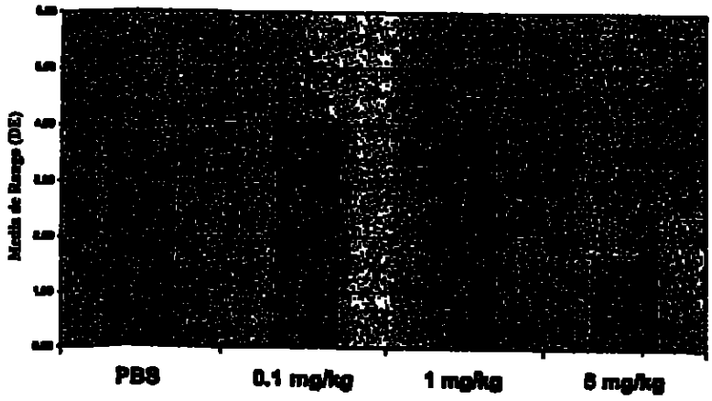


El MC1 Neutraliza la actividad MCSF humana



4/65

Fig. 6



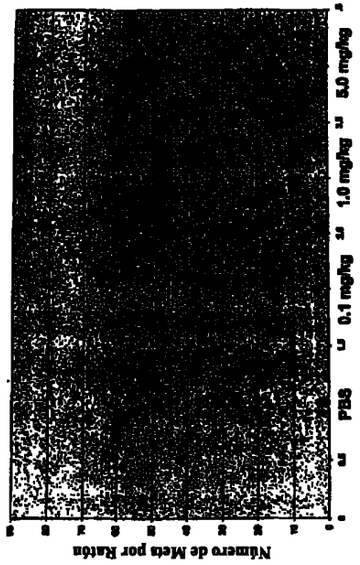


Fig. 7

467

FIG. 8A

Unión de anticuerpo MCSF específico para líneas de células de cáncer de seno MDA231

Rojo: Sin anticuerpo de control
Negro: Anticuerpo M-CSF 1 ug/ml
Verde: Anticuerpo M-CSF 10 ug/ml
Azul: Anticuerpo M-CSF 50 ug/ml

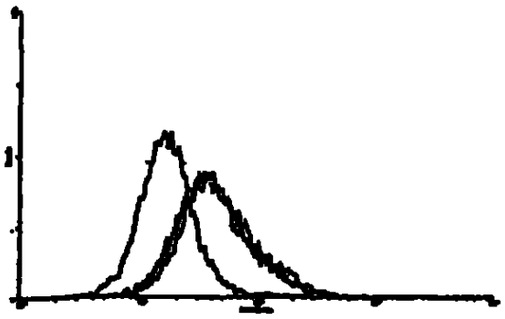
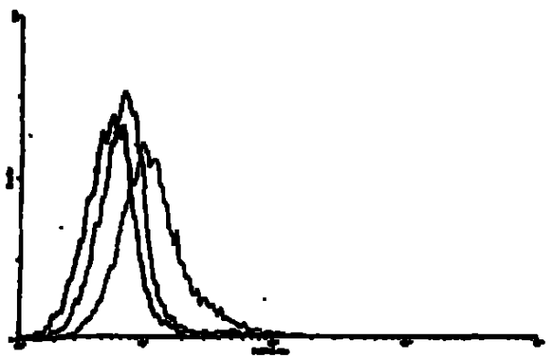


FIG. 8B

Unión de anticuerpo MCSF específico a líneas de células de cáncer de mieloma múltiple ARB77

Rojo: Sin anticuerpo de control
Verde: Anticuerpo M-CSF 5 ug/ml
Azul: Control IgG2a 5 ug/ml



468

FIG. 9

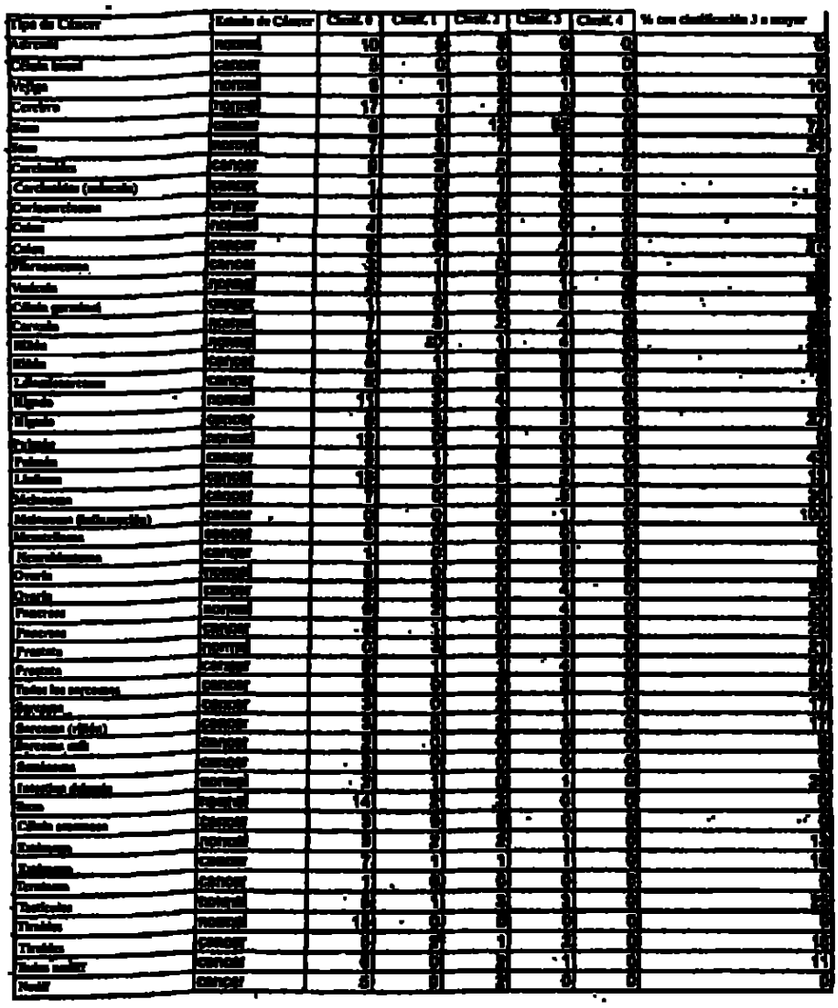


Fig. 10

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95

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

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175

Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
        195                 200                 205

Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
    210                 215                 220

Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240

Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
                245                 250                 255
```

Fig. 11

```
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1               5                  10                  15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
            20                  25                  30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
        35                  40                  45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
    50                  55                  60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
                85                  90                  95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
            100                 105                 110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
        115                 120                 125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
    130                 135                 140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145                 150                 155                 160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
                165                 170                 175
Glu Cys Ser Ser Glu Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
            180                 185                 190
Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
        195                 200                 205
Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
    210                 215                 220
Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225                 230                 235                 240
Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
                245                 250                 255
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
            260                 265                 270
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
        275                 280                 285
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
    290                 295                 300
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Glu Gly
305                 310                 315                 320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
                325                 330                 335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
            340                 345                 350
Ser Ala Lys Gly Glu Glu Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
        355                 360                 365
Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Glu Asp Trp Asn His Thr Pro
    370                 375                 380
Glu Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
385                 390                 395                 400
Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Glu Gly Leu Ser Asn Pro
                405                 410                 415
Ser Thr Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
            420                 425                 430
Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
        435                 440                 445
Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
    450                 455                 460
Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
465                 470                 475                 480
His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
                485                 490                 495
Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
            500                 505                 510
Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
        515                 520                 525
Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Gln Gly Ser Pro Leu Thr
    530                 535                 540
Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
```

Fig. 12

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175
Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180 185 190
Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195 200 205
Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210 215 220
Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225 230 235 240
Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245 250 255
Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
260 265 270
Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
275 280 285
Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
290 295 300
Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305 310 315 320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
325 330 335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
340 345 350
Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
355 360 365
Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
370 375 380
Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
385 390 395 400
Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
405 410 415
Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
420 425 430
Gln Val Glu Leu Pro Val

FIG. 13

Secuencia de proteína de cadena pesada 5H4

```
   1  EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT GYFMNWVKQS HGKSLEWIGY
  51  ISCYNGDTNY NQNFKGKATF TVDTSSSTAY MQFNSLTSED SAVYYCARSG
 101  GNYPAYWGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV TLGCLVKGYF
 151  PEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVPSS TWPSETVTCN
 201  VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLTITLT
 251  PKVTCVVVDI SKDDPEVQFS WFVDDVEVHT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL
 301  PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE
 351  QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ PAENYKNTQP IMDTDGSYFV
 401  YSKLNVQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNHH TEKSLSHSPG K
```

Secuencia de proteína de cadena liviana 5H4

```
   1  DIVMTQSHKF MSTSVGDRVT ITCKASQNVG TAVFWYQQKP GQSPKLLIYW
  51  TSTRRAGVPD RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFCQQ YSSYPLTFGA
 101  GTKLELKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
 151  DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
 201  STSPIVKSFN RNEC
```

FIG. 14

Secuencia de proteína de cadena pesada MC-1

```
  1   EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSGFTFS DYIMNWVRQT PEKRLEWVAE
 51   INSGGGSTIY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSRLKSED TAMYYCARQG
101   SYGYPFAYWG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG
151   YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT
201   CNVAHPASST KVDKKIEPRG PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK
251   DVLMISLSPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS
301   TLRVVSALPI QHQDWMSGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPQV
351   YVLPPPEEEM TKKQVTLTCM VTDFMPEDIY VEWTNNGKTE LNYKNTEPVL
401   DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KSFSRTPGK
```

Secuencia de proteína de cadena liviana MC-1

```
  1   AIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQSIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
 51   TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYCQQ YSKLPWTFGG
101   GTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
151   DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201   STSPIVKSFN RNEC
```

474

FIG. 15

Secuencia de proteína de cadena pesada MC-3

```
   1  DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG
  51  YISYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNQFF LQLNSVTTED TATYYCARLS
 101  YWLFDYWGQG TTLTVSSAKT TPPSVYPLAP GCSDTTGSSV TLGCLVKGYF
 151  PESVTVTWNS GSLSSGVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQTVTCS
 201  VAHPASSTTV DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP
 251  PNIKDVLMIS LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWFVNNVEV HTAQTQTHRE
 301  DYNSTIRVVS TLPIQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKGLVR
 351  APQVYILPPP AEQLSRKDVS LTCLVVGFNP GDISVEWTSN GHTEENYKDT
 401  APVLDSDGSY FIYSKLNMKT SKWEKTDSFS CNVRHEGLKN YYLKKTISRS
 451  PGLEDDICA EAHDGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF
 501  SSVVELKQKI SPDYRNMIGQ GA
```

Secuencia de proteína de cadena liviana MC-3

```
   1  DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TNIHWYQQRT NGSPRLLIKY
  51  ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWPTTFGG
 101  GTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
 151  DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
 201  STSPIVKSFN RNEC
```

FIG. 16A

Para cadena pesada CDR1:

```
                      1
     H_CDR1_5H4  (1)  -G[redacted]FMH
     H_CDR1_MC-1 (1)  -[redacted]YMY
H_CDR1_CHIR-RX1  (1)  [redacted]
     H_CDR1_MC-3 (1)  [redacted]
       Consensus (1)  SDYAMN
```

Para cadena pesada CDR2:

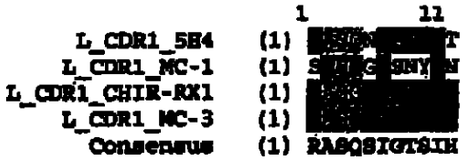
```
                      1                   17
     H_CDR2_5H4  (1)  [redacted]
     H_CDR2_MC-1 (1)  [redacted]
H_CDR2_CHIR-RX1  (1)  [redacted]
     H_CDR2_MC-3 (1)  [redacted]
       Consensus (1)  YIS YSGSTSYNPSLKS
```

Para cadena pesada CDR3:

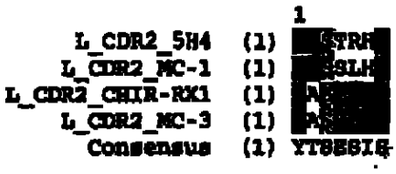
```
                      1
     H_CDR3_5H4  (1)  --[redacted]
     H_CDR3_MC-1 (1)  QGS[redacted]
H_CDR3_CHIR-RX1  (1)  -F[redacted]
     H_CDR3_MC-3 (1)  --LET[redacted]
       Consensus (1)    DYGW FDY
```

FIG. 16B

Para cadena liviana CDR1:



Para cadena liviana CDR2:



Para cadena liviana CDR3:

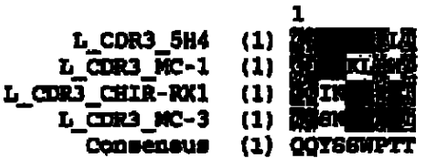


Fig. 17

Actividad de neutralización de mAbs vs. Fabs

mAb intacto **Fab**

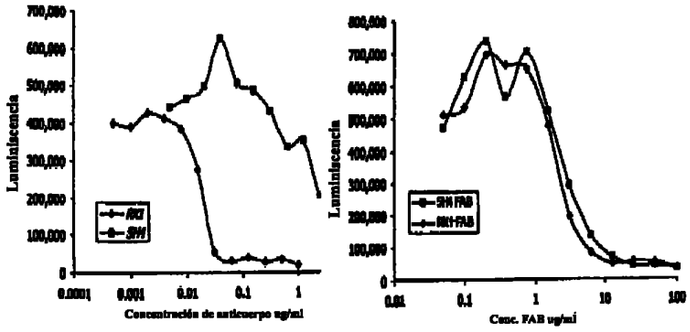


Fig. 18

Estructura MCSF con Epítopos RX1 Resaltados

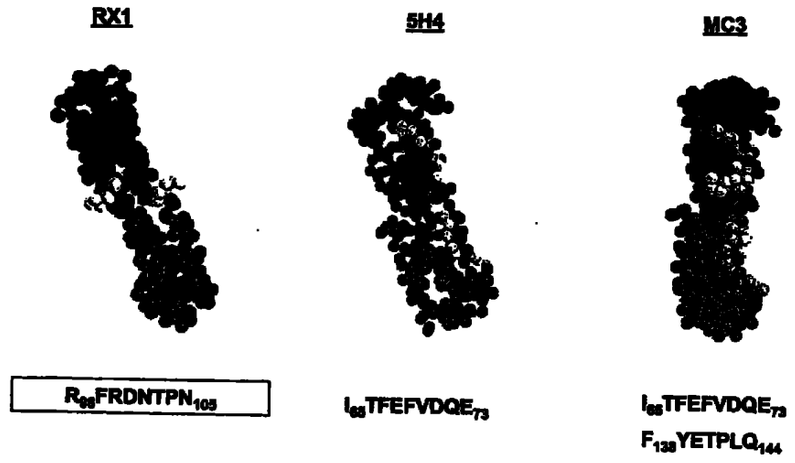


FIG. 19A

Cadena Pesada

Región-V	No. de Cambios	Aminoácidos 1-57
Riesgo		MHLHLHLHQLLMLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHHHLMLLMHMHHHHHHHHHHHH
Ratón		DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMGYIS---YSGST
Humano		qvqLqesGpgLVkPsqTLsLTCxvsGxsxSsxxxxxxWiRQpPgkgLEWigxiyyraxxgxt
Bajo Riesgo	2	DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGKKLEWMGYIS---YSGST
Mod+Bajo	5	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWN-WIRQFPGRGLEWMGYIS---YSGST

Región-V	No. de Cambios	Aminoácidos 58-113
Riesgo		HMHMHMHMLMHLHLHLMLLMLHLHLHLLHLLLHLHMHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLMLL
Ratón		SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTSVTVSS
Humano		xynpSlksRvTisvDTSKNQfsLxlxsvtaaDTAvYyCArxxxxxxxxxxxxxxxxxfdxWGqGtxVTVSS
Bajo Riesgo	6	SYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTTVTVSS
Mod+Bajo	7	SYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTTVTVSS

WO 2005/068503
23/44
PCT/US2005/000546

FIG. 19B

Cadena Pesada y de Bajo Riesgo Vs. Consensus Kabat Vh2:

Secuencia de Proteína:

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMD
YWGQGTTVTVSS

Secuencia de ADN:

GACGTACAACTTCAAGAATCTGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTACGCTT
GGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCTCCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCAC
AATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATTCTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTGACTACGCTCACG
CCATGGATTATTGGGGACAGGGTACTACCGTTACCGTAAGCTCA

Bajo Riesgo+Cadena Pesada de Riesgo Moderado Vs. Consensus Kabat Vh2:

Secuencia de Proteína

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMD
YWGQGTLVTVSS

Secuencia de ADN:

CAAGTTCAACTTCAAGAATCAGGCCCCCGGACTCGTTAAACCCTCTCAAACTCTCTCTCTTACTTGCACTGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTACGCTTG
GAACTGGATCAGACAATTTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGATGGGATATATCTCTTACTCTGGCTCAACCTCTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAAC
AATCTCACGCGATACTTCTAAAAATCAATTCTCACTTCAACTTAACTCCGTTACTGCCGCCGACACTGCCGTTTACTACTGTGCTTCCTTCGATTACGCCCACG
CTATGGATTATTGGGGACAAGGAACTACCGTCACTGTCAGCTCA

FIG. 20A

Cadena Liviana

Región-V	No. de Cambios	Aminoácidos 1-52
Riesgo		LHLHLHLMLLMLMLMLLLHLHLHLMMMMMMMMMMMMMMMMLMLLMMMMMMMMM
Ratón		DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS
Humano		EIVlTQSPgTLSlSPGERaTLSCRASQSvssyL---AWYQQkPGQAPRLLIYgAS
Bajo Riesgo	8	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTGQSPRLLIKYAS
Mod+Bajo	9	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTGQAPRLLIKYAS

Región-V	No. de Cambios	Aminoácidos 53-109
Riesgo		HLMMLMMLMMLHLHLHLHLLHLHLMLLHLLLHLMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMHLHHLHLLLLLL
Ratón		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA
Humano		sRATGIPdRFSGSGSGTDFTLTISrLepEDFAVYYCQQygsspp-----xTFGqGTKvEI-KRT
Bajo Riesgo	8	ERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT
Mod+Bajo	10	ERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT

WO 2005/068503

PCT/US2005/000546

FIG. 20B

Cadena Liviana y de Bajo Riesgo Vs. Consensus Kabat Vk3:

Secuencia de proteína:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASESMSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

Secuencia de Nucleotido:

GAAATAGTCCTTACCCAATCTCCCGGAACCCTCTCAGTATCTCCCGGCGAACGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAATCCATCGGCACTTCAATTCACT
GGTATCAGCAGAAAACAGGTCAATCCCCACGGCTTCTTATAAAATATGCATCAGAAAGAATATCAGGCATTCCAGACAGATTCTCAGGTTCAGGTTCAGGC
ACAGACTTCACACTTACAATTTCCCGCGTCGAATCCGAAGACTTCGCTGACTATTACTGCCAACAAATCAACTCATGGCCTACTACTTTCGGTCAAGGCACC
AAACTCGAAATTAAACGTACG

Bajo Riesgo+Cadena Liviana de Riesgo Moderado Vs. Consensus Kabat Vk3:

Secuencia de proteína:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

Secuencia de Nucleotido:

GAAATAGTTCTTACTCAATCCCCCGGTACACTCTCAGTTTCCCCAGGCGAACGCGTCACTTTTTCTTGCAGAGCATCACAATCAATCGGCACTTCAATTCATT
GGTATCAACAAAAAACAGGACAGGCCCCACGACTTCTTATTAAATATGCATCAGAACGAGCCACAGGCATCCCAGACAGATTTTCAGGTTCAGGATCAGGC
ACCGATTTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACA
AAACTCGAAATTAAACGTACG

FIG. 21A

Cambios de Cadena Livia Regresan a Murina

Región-V	No. de Cambios	Aminoácidos 1-52
Riesgo		LHLHLHLMLLMLLMLHLMLLLLHLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHLMLLMHHHHHHHHH
Ratón		DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS
Humano		EIVLTQSPgTLSLSPGERaTLSCRASQSvsasyL---AWYQQkPGQAPRLLIYgAS
Bajo Riesgo	8	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQKTGQSPRLLIKYAS
Mod+Bajo	9	EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIH----WYQQKTGQAPRLLIKYAS

Región-V	No. de Cambios	Aminoácidos 53-109
Riesgo		HLAHHLHHLHHLHHLHLHLHLLHLLLHLLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLLLLLL
Ratón		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA
Humano		sRATGIPdRFSGSGSGTDFTLTIsrLepEDFAVYYCQQygssppt-----xTFGqGTKvEI-KRT
Bajo Riesgo	8	ERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTIERVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT
Mod+Bajo	10	ERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIERVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT
Low+Mod Alternate	7	ERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTIERVESEDFADYYCQQINSWPT------TFGQGTKLEI-KRT

WO 2005/068503

PCT/US2005/000546

FIG. 21B

Cadena Liviana y de Bajo Riesgo Vs. Consensus Kabat Vk3; Cambia de regreso a murina:

Secuencia de proteína:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQSPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQSNSWPTTFGQGTKLEIKRT

Secuencia de Nucleotido:

GAAATAGTCCTTACCCAATCTCCCGGAACCCTCTCAGTATCTCCCGGCGAACGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAATCCATCGGCACTTCAATTCACT
GGTATCAGCAGAAAACAGGTCAATCCCCACGGCTTCTTATAAAATATGCATCAGAATCAATTTCTGGCATCCCAGACAGATTTTCAGGTTCAGGATCAGGCA
CCGATTTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACAA
AACTCGAAATTAAACGTACG

28/44

Bajo Riesgo+Cadena Liviana de Riesgo Moderado Vs. Consensus Kabat Vk3; AA 54, 56 Cambia de regreso a murina:

Secuencia de proteína:

EIVLTQSPGTLSVSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQQKTGQAPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQQSNSWPTTFGQGTKLEIKRT

Secuencia de Nucleotido:

GAAATAGTTCTTACTCAATCCCCCGGTACACTCTCAGTTTCCCCAGGCGAACGCGTCACTTTTTCTTGCAGAGCATCACAATCAATCGGCACTTCAATTCATT
GGTATCAACAAAAAACAGGACAGGCCCCACGACTTCTTATTAAATATGCATCAGAATCAATTTCTGGCATCCCAGACAGATTTTCAGGTTCAGGATCAGGCA
CCGATTTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGCAGATTACTATTGTCAACAAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACAA
AACTCGAAATTAAACGTACG

FIG. 21A

Cadena Liviana - Cambios basados en HK6 2-1-1(A14)

Región-V	No. de Cambios	Aminoácidos 1-52
Riesgo		LHLHLHLMLLMLHLMLLLHLHLHLHMHHHHHHHHHHHHHHMHLMLLMHHMHHHHHH
Ratón		DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS
Humano		DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCQASEGIGNYLY----WYQQKPDQAPKLLIKYAS
Bajo Riesgo	10	DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIH----WYQQKTDQSPRLLIKYAS
Mod+Bajo	12	DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIH----WYQQKTDQAPKLLIKYAS

Región-V	No. de Cambios	Amininoácidos 53-109
Riesgo		HLMHLHHLMHHLHLHLHLLHLHLHLLHLLLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHHLHLLLLLL
Ratón		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA
Humano		QSISGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYCQQGNKHP------LTFGGGTKVEI-KRT
Bajo Riesgo	5	ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRT
Mod+Bajo	5	ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRT

FIG. 22B

Cadena Liviana de Bajo Riesgo Vs. Subgrupo VK6 2-1-(1) A14:

Secuencia de proteína:

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIHWYQQKTDQSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQINSWPTTFGGGTKLEIKRT

Secuencia de Nucleotido: No sintetizado

Bajo Riesgo+Cadena Liviana de Riesgo Moderado Vs. Subgrupo VK6 2-1-(1) A14:

DIVLTQSPAFLSVTPGEKVTFTCQASQSIGTSIHWYQQKTDQAPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSVEAEDAADYYCQQI
NSWPTTFGGGTKLEIKRT

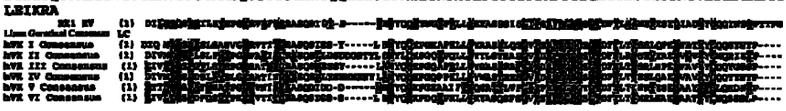
Secuencia de Nucleotido:

GACATAGTTCTCACACAATCACCAGCATTCCTCTCAGTTACACCCGGCGAAAAAGTAACCTTTACCTGTCAGGCTTCTCAATCTATCGGCACTTCTATTCACT
GGTATCAACAAAAAACCGATCAAGCTCCTAAACTCCTCATAAAATACGCATCCGAATCCATCTCCGGTATCCCCTCCAGATTTTCAGGCTCCGGCTCCGGCA
CAGATTTCACCCTTACCATTAGCTCAGTTGAAGCCGAAGACGCAGCTGATTACTACTGTCAACAAATAAACTCATGGCCCACTACTTTCGGCGGCGGCACTA
AACTCGAAATAAAACGTACG

FIG. 23A

Cadena Liviana de Murina RX-1:

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQIWSWPTTFGGGTK
LEIKRA



CADENA LIVIANA mitad amino

RX-1 DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSI--GTSIH----WYQQRTNGSPRLLIKYAS

pos... 10 20 abcdef 30 40 50

Kabat:

HK1...DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSLVXX-XISXXLXWYQQKPGKAPKLLIYXAS
HK2...DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSXDGXXYLNWYLQKPGQSPQLLIYXXS
HK3...EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS-----VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS
HK4...DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS

Linea Germinal de Consenso (con Jk6):

hVK1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQS------ISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS
hVK2 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLS
hVK3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS-----VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS
hVK4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
hVK5 ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDD------DMNWYQQKPGEAAIFIIQEAT
hVK6 EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIG------SSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS

FIG. 23B

CADENA LIVIANA mitad amino

```
RK-1   ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT------TFGGGTKLEI-KRA

pos...      60        70        80        90      abcdef  100       a

Kabat:

HK1...XLXSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQXXXXPE-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK2...NRXSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAXQKPR-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK3...SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPP-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK4...TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP------XTFGQGTKVEI-KRT

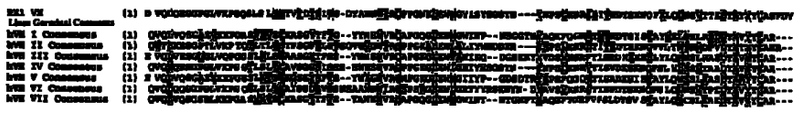
Linea Germinal de Consensus (con Jk4):

hVK1   SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK2   YRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK3   SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK4   TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK5   TLVPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCLQHDNFP------LTFGGGTKVEI-KRT
hVK6   QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP------LTFGGGTKVEI-KRT
```

FIG. 24A

Cadena Pesada de Murina RX-1:

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYC
ASFDYAHAMDYWGQGTSVTVSS



CADENA LIVIANA mitad amino

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMGYIS---YSGST

pos ... 10 20 30 ab 40 50 abc

Xabat:

HH1 ...XVQLVQSGAEVKKPGXSVKVSCKASGYTFXSYXIX--WVRQAPGQGLEWMGXIXPY-XXGXT
HH2 ...QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCKVSGXSXSXXXXXXXWIRQPPGKGLEWIGXIYYRAXXGXT
HH3 ...EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXYXMX--WVRQAPGKGLEWVXXIXXXXXGXXT

Linea Germinal de Consenso (con JH4):

hVHI QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMH--WVRQAPGQGLEWMGWINP--HSGGT
hVHII QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALIY---WNDDK
hVHIII EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS--WVRQAPGKGLEWVANIK--QDGSEK
hVHIV QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGGSISSSNWW-SWVRQPPGKGLEWIGEIY---HSGST
hVHVV EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG--WVRQMPGKGLEWMGIIYP--GDSDT
hVHVI QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYY-RSKWYN
hVHVII QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMN--WVRQAPGQGLEWMGWINT--NTGNP

FIG. 23B

CADENA PESADA mitad carboxi

```
        SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASFDYAHAM----------DYWGQGTSVTVSS

pos ... 60        70        80  abc       90        100abcdefghijk        110

Kabat:

HH1 ...NYAQKFQGRVTITXDXSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXDXXFDXWGQGTLVTVSS
HH2 ...XYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLXLXSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXXFDXWGQGTXVTVSS
HH3 ...YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAXXXXXXXXXXXXXXXYYXXFDXWGQGTLVTVSS

Linea Germinal de Consensus (con JH4):

hVHI    NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHII   RYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHRXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHIII  YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHIV   NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHV    RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHVI   DYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
hVHVII  TYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGTLVTVSS
```

Figura 24C

Numeración Kabat de 5H4

Secuencia de proteína de cadena pesada 5H4

1-30: EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT
31-35: GYFMN
36-49: WVKQSHGKSLEWIG
50-65: YIS C (52A) YNGDTNY NQNFKG
66-94: KATF TVDTSSSTAY MQF N (52A) S(52B) L(52C) TSED SAVTYCAR
95-102: EGGNYPAY
103-437: WGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV
TLGCLVKGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVPSS TWPSETVTCN
VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLTITLT PKVTCVVVDI
SKDDPEVQFS WFVDDVEVKT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA
AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ
PAENYKNTQP IMDTDGSYFV YSKLNVQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNHH TEKSLSHSPG K

Secuencia de proteína de cadena liviana 5H4

1-23: DIVMTQSHKF MSTSVGDRVT ITC
24-34: KASQNVG TAVT
35-49: WYQQKPGQSPKLLIY
50-56: WTSTRHA
57-88: GVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFC
89-97: QQYSSYPLT
98-214: FGAGTKLELKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
STSPIVKSFN RNEC

Figura 24D

Numeración Kabat de Mc1

Secuencia de proteína de cadena liviana MC-1:

1-30: EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSGFTFS
31-35: DYYMY
36-49: WVRQTPEKRLEWVA
50-65: YIS N (52A) GGSTYY PDTVKG
66-94: RFTI SRDNAKNTLY LQM S (52A) R (52B) L (52C) KSED TAMYYCAR
95-102: QGSTGYFPAY
103-449: WG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW
NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRG
PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK DVLMISLSPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF
VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS TLRVVSALPI QHQDWMSGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK
PKGSVRAPQV YVLPPPEEEM TKKQVTLTCM VTDFMPEDIY VEWTNNGKTE LNYKNTEPVL
DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KSFSRTPGK

Secuencia de proteína de cadena liviana MC-1:

1-23: AIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC
24-34: SASQGIS NYLN
35-49: WYQQKP DGTVKLLIY
50-56: YTSSLHS·
57-88: GVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYC
89-97: QQ YSKLPWT
98-214: FGGGTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPIVKSFN
RNEC

Figura 24E

Numeración Kabat de MC3

Secuencia de proteína de cadena pesada MC-3:

1-30: DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT
31-35: SDYAW N (35A)
36-49: WIRQ FPGNKLEWMG
50-65: YISYSGSTSY NPSLKS
66-94: RISIT RDTSKNQFFL QL N (92A) S (92B) V (92C) TTEDT ATYYCAR
95-102: LETWLFDY

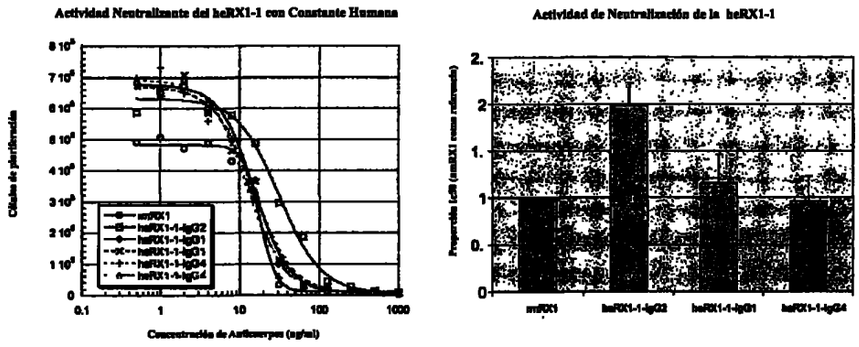
103-322: WGQG TTLTVSSAKT TPPSVYPLAP GCGDTTGSSV TLGCLVKGYF PESVTVTWNS
GSLSSGVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQTVTCS VAHPASSTTV
DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP PNIKDVLMIS
LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWFVNNVEV HTAQTQTHRE DYNSTIRVVS
TLPIQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKGLVR APQVYILPPP
AEQLSRKDVS LTCLVVGFNP GDISVEWTSN GHTEENYKDT APVLDSDGSY
FIYSKLNMKT SKWEKTDSFS CNVRHEGLKN YYLKKTISRS PGLDLZDICA
EAKDGELDGL WTTITIFIGL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF SSVVELKQKI
SPDYRNMIGQ GA

Secuencia de proteína de cadena liviana MC.3

1-23: DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSC
24-34: RASQSIG TSIH
35-49: WYQQRT NGSPRLLIK
50-56: YASESIS
57-88: GIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADTYC
89-97: QQ SNSWPTT
98-214: FGG GTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
STSPIVKSFN RNEC

Fig. 25

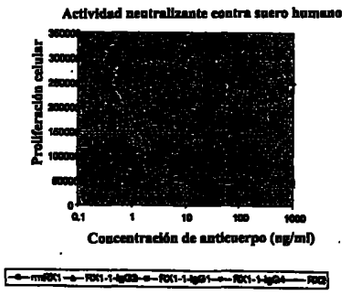
Medición de Actividad Neutralizante de heRX1 Con Diferentes Regiones Constantes de Subclase IgG



Contra MCSF humano recombinante

Fig. 26

Actividad de heRX1-1 con Diferentes Subclases IgG Contra Otras Formas de MCSF

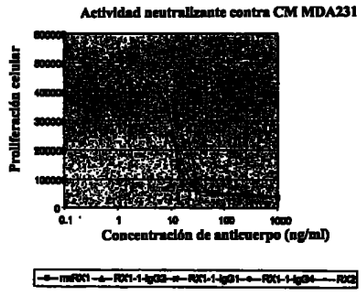


Resultado similar observado contra MCSF Clano en suero y MCSF Clano recombinante

495

Fig. 27

Actividad de heRX1-1 con Diferentes Subclases IgG Contra Otras Formas de MCSF

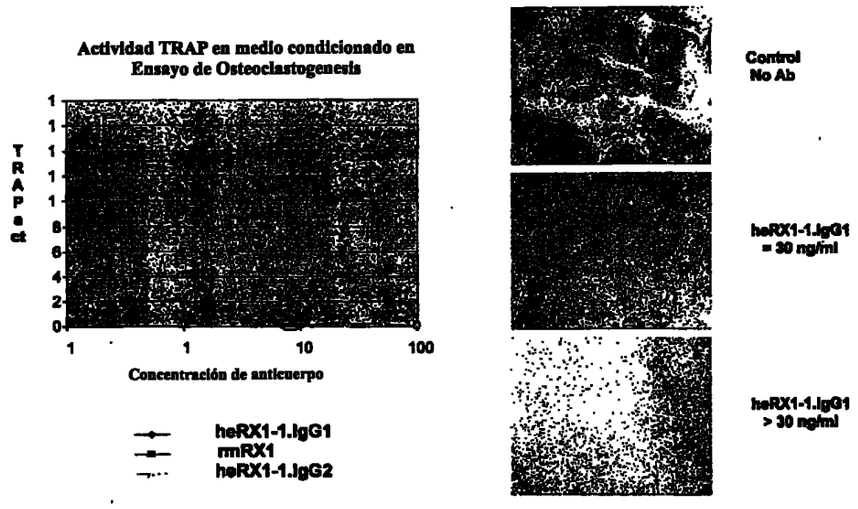


Resultado similar observado contra MCSF Clano en suero y MCSF Clano recombinante

496

Fig. 28

Ensayo de Osteoclastogenesis de heRX1-1 Con Diferentes Subclases IgG



WO 2005/068503
41/44
PCT/US2005/000546

498

Aminoácidos

MGWSCIILFLVATATGVHS

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSL
QLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK*

Nucleotidos

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCA
CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

Aminoácios

MGWSCIILFLVATATGVHS

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSL
QLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK*

Nucleotidos

ATGGGTTGGTCTTGCATCATTCTCTTTCTCGTCGCTACCGGAACTGGTGTACACTCCCAAGTTCAAGTTCAAGAATCA
GGCCCCCGGACTCGTTAAACCCTCTCAAACTCTCTCTCTTACTTGCACTGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTAC
GCTTGGAACTGGATCAGACAATTTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGATGGGATATATCTCTTACTCTGGCTCAACCT
CTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAACAATCTCACGCGATACTTCTAAAAATCAATTCTCACTTCAACTTAAC
TCCGTTACTGCCGCCGAGACTGCCGTTTACTACTGTGCTTCCTTCGATTACGCCCACGCTATGGATTATTGGGGACA
AGGAACTACCGTCACTGTCAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGTCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

Fig. 30

Cadena Pesada de Bajo Riesgo HcRX-1

Aminoácidos

MGWSCIILFLVATATGVHSDVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGKKLEWMGYITYSGSTSYN
PSLKSRITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAIYYCASFDYAHAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTETYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Nucleotidos

cADN

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCCCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCA
GTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGA
CGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAC
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

Genómico

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACTCTGACGTACAACTTCAAGAATC
TGGCCCAGGTCTCGTCAAACCTTCTCAAACTCTCTCACTCACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCACGCATCACAATTTCCCCCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACTCAATT
CTGTTACCGCCGCCGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCT
GGACGCACCCCCGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCT
GACCACCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGC
CCCTACCCCAGGCCCTGCGCATACAGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCT
GCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTG
AGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGG
CCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTCCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTG
ACGCATCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCAAAACCC
AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGG
TCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGCGAGG
GCCACATGGACAGAGGTCAGCTCGGCCCACCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGG
GCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA
CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCTGGGTAAATGA

501

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* 21601.003

Box No. I TITLE OF INVENTION

M-CSF SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND USES THEREOF

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

CHIRON CORPORATION
Intellectual Property R-338
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

Telephone No.

Facsimile No. (510) 655-3542

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

LIU, Cheng
c/o CHIRON CORPORATION
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☐ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

ALEXANDER, Lisa E.
CHIRON CORPORATION
Intellectual Property R-338
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

Telephone No. (510) 923-2585

Facsimile No. (510) 655-3542

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☒ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III **FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

ZIMMERMAN, Deborah Lee
c/o CHIRON CORPORATION
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [x] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [x] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

HARROWE, Gregory Martin
c/o CHIRON CORPORATION
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [x] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [x] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

KOTHS, Kirston
c/o CHIRON CORPORATION
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [x] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [x] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

KAVANAUGH, William Michael
c/o CHIRON CORPORATION
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [x] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [x] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

[x] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Continuation of Box No. III **FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

LONG, Li
c/o CHIRON CORPORATION
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [x] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: CA

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [x] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

CALDERON-CACIA, Maria
c/o CHIRON CORPORATION
P.O. Box 8097
Emeryville, California 94662
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [x] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [x] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

HORWITZ, Arnold H.
2720 Lakeview Drive
San Leandro, California 94577
United States of America

This person is:
- [ ] applicant only
- [x] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: US

State *(that is, country)* of residence: US

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [x] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: [ ] all designated States [ ] all designated States except the United States of America [ ] the United States of America only [ ] the States indicated in the Supplemental Box

[ ] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ **DE Germany is not designated for any kind of national protection.**

☐ **KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection.**

☐ **RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection.**

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

	Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
			national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application receiving Office
item (1)	07 January 2004 (07.01.2004)	60/535,181	US		
item (2)	02 June 2004 (02.06.2004)	60/576,417	US		
item (3)					

☐ **Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.**

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) ***(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)*** **identified above as:**

☒ **all items** ☐ **item (1)** ☐ **item (2)** ☐ **item (3)** ☐ **other, see Supplemental Box**

** Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):*

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) ***(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):***

ISA/EP

Request to use results of earlier search; reference to that search ***(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):***

Date ***(day/month/year)*** **Number** **Country** ***(or regional Office)***

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) ***(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):***

Number of declarations

☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:

305

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) In paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	5
description (excluding sequence listings and/or tables related thereto)	:	124
claims	:	17
abstract	:	1
drawings	:	44
Sub-total number of sheets	:	191
sequence listings	:	98
tables related thereto	:	
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	289

(b) [ ] only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) [ ] sequence listings
- (ii) [ ] tables related thereto

(c) [ ] also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) [ ] sequence listings
- (ii) [ ] tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- [ ] sequence listing:
- [ ] tables related thereto:

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*:

		Number of items
1. [x] fee calculation sheet	:	1
2. [ ] original separate power of attorney	:	
3. [ ] original general power of attorney	:	
4. [ ] copy of general power of attorney; reference number, if any:	:	
5. [ ] statement explaining lack of signature	:	
6. [ ] priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):	:	
7. [ ] translation of international application into *(language)*:	:	
8. [ ] separate indications concerning deposited microorganisms or other biological material	:	
9. [x] sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*		
(i) [x] copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application)	:	diskette (1)
(ii) [ ] *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter*	:	
(iii) [x] together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings part mentioned in left column	:	1
10. tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*		
(i) [ ] copy submitted for the purposes of international search under Section 802 (b-*quater*) only (and not as part of the international application)	:	
(ii) [ ] *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802 (b-*quater*)	:	
(iii) [ ] together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column	:	
11. x other *(specify)*: Return receipt post card	:	1

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Li-Hsien Rin-Laures

Li-Hsien Rin-Laures, Agent for Applicants
MARSHALL, GERSTEIN & BORUN LLP

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:		2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		[ ] received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		[ ] not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. [ ] Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

506

This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application.

PCT

FEE CALCULATION SHEET
Annex to the Request

For receiving Office use only

International Application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's file reference: 21601.003

Applicant: CHIRON CORPORATION et al.

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE . . . . . 300.00 [T]

2. SEARCH FEE . . . . . 1,920.00 [S]

International search to be carried out by: EP
(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search)

3. INTERNATIONAL FILING FEE

Where item (b) and/or (c) of Box No. IX apply, enter Sub-total number of sheets
Where item (b) and (c) of Box No. IX do not apply, enter Total number of sheets } 289

[i1] first 30 sheets . . . . . 1,134.00 [i1]

[i2] 259 (number of sheets in excess of 30) x 12.00 (fee per sheet) = 3,108.00 [i2]

[i3] additional component (only if sequence listing and/or tables related thereto are filed in computer readable form under Section 801(a)(i), or both in that form and on paper, under Section 801(a)(ii)):

400 x _____ (fee per sheet) = _____ [i3]

Add amounts entered at i1, i2 and i3 and enter total at I . . . . 4,242.00 [I]
(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the international filing fee)

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT *(if applicable)* . . . . 40.00 [P]

5. TOTAL FEES PAYABLE . . . . . $ 6,502.00
Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box. TOTAL

MODE OF PAYMENT

- [ ] authorization to charge deposit account (see below)
- [ ] postal money order
- [ ] cash
- [ ] coupons
- [x] cheque
- [ ] bank draft
- [ ] revenue stamps
- [ ] other *(specify)*:

AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT

(This mode of payment may not be available at all receiving Offices)

- [ ] Authorization to charge the total fees indicated above.
- [x] *This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving office so permit)* Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.
- [ ] Authorization to charge the fee for priority document.

Receiving Office: RO/ US

Deposit Account No.: 13-2855

Date: 6 January 2005

Name: Li-Hsien Rin-Laures

Signature: Li-Hsien Rin-Laures

PATENT COOPERATION TREATY

507

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
CHIRON CORPORATION
Intellectual Property R-338
Attn. Alexander, Lisa E.
P.O. Box 8097
Emeryville CA 94662
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 21601.003	Date of mailing (day/month/year) 16/09/2005 FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2005/000546	International filing date (day/month/year) 06/01/2005
Applicant CHIRON CORPORATION	

1. [x] The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Fascimile No.: (41-22) 740.14.35

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. [ ] With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   [ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   [ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

   Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an International preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

DOCKETED on/by SZL 10-5-05
Atty LEA PA
File # PP021601.0003
Due Date Ext
Final Date 11-16-05 DLF (Art 19)
12-16-05 RSD (Wr. Op.)
12-16-05 DLF

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sabine Oblinger

Form PCT/ISA/220 (January 2004) (See notes on accompanying sheet)

Untitled based on ISR

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

508

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

BNSDOCID: <XB _ _ISA220NOENP4 1 >

509

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new;

(iv) the claim replaces one or more claims as filed;

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."

2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."

3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 8 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."

4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

BNSDOCID: <XS_... _ISA220NOENP4 1 >

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

510

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
21601.003		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2005/000546	06/01/2005	07/01/2004
Applicant		
CHIRON CORPORATION		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
      [ ] The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
   b. [X] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. [ ] Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant.
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant.
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant.
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/000546 511

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   - [X] a sequence listing
   - [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   - [X] in written format
   - [X] in computer readable form

   c. time of filing/furnishing

   - [X] contained in the international application as filed
   - [X] filed together with the international application in computer readable form
   - [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/000546

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/00 C12N15/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/08565 A (CANCER RESEARCH FUND OF CONTRA COSTA; DO COUTO, FERNANDO, J., R; CERIA) 21 March 1996 (1996-03-21) examples 1-13	3-8, 12-161
P,X	WO 2004/045532 A (CHIRON CORPORATION) 3 June 2004 (2004-06-03) abstract page 3, line 1 - line 11 page 3, line 22 page 3, line 28 - line 31 page 4, line 13 - line 15 page 4, line 27 - page 5, line 3 page 6, line 22 - page 8, line 5 page 19, line 27 - page 33, line 9 page 67, line 23 - page 80, line 3	3-8, 12-161

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 June 2005	16/09/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Chavanne, F

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	GB 2 405 873 A (* WARNER-LAMBERT COMPANY LLC; * ABGENIX INC) 16 March 2005 (2005-03-16) abstract figure 4 paragraph '0014! - paragraph '0016! paragraph '0101! - paragraph '0103! paragraph '0127! - paragraph '0141! table 1 paragraph '0171! - paragraph '0200! paragraph '0211! - paragraph '0271! examples I,II,VI,VII	3-8, 12-52, 59-161

4

International Application No. PCT/US2005 /000546

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 89-106 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1, 2, 9-11

Present claims 1, 2 and 9-11 relate to an antibody defined by parameters.The use of these parameters in the present context is considered to lead to a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT. It is impossible to compare these parameters the applicant has chosen to the technical feature characterising the antibodies set out in the prior art. Consequently, a search of present claims 1, 2 and 9-11 is impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/000546

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 89-106 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.: 1, 2, 9-11
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2005/000546

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9608565 A	21-03-1996	AU 707159 B2	01-07-1999
		AU 3588795 A	29-03-1996
		CA 2200097 A1	21-03-1996
		EP 0784684 A2	23-07-1997
		WO 9608565 A2	21-03-1996
WO 2004045532 A	03-06-2004	AU 2003291002 A1	15-06-2004
		WO 2004045532 A2	03-06-2004
GB 2405873 A	16-03-2005	NL 1027009 A1	14-03-2005
		US 2005059113 A1	17-03-2005
		WO 2005030124 A2	07-04-2005

ATENT COOPERATION TRE TY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2005/000546	06.01.2005	07.01.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K16/00, C12N15/13

Applicant
CHIRON CORPORATION

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:

European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Chavanne, F

Telephone No. +49 89 2399-8399

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

   ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☒ in written format

   ☒ in computer readable form

   c. time of filing/furnishing:

   ☒ contained in the international application as filed.

   ☒ filed together with the international application in computer readable form.

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2005/000546

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1,2,9-11,89-106

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 89-106 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1,2,9-11

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard
the computer readable form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

58 59

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2005/000546

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	3,4,12-76,107-109,125-140,154-161
	No:	Claims	5-8,77-106,110-124,141-153
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	3-8,12-161
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	3-8,12-88,107-161
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The subject-matter of claims 1, 2 and 9-11 has not be searched. Consequently, an opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability for said subject-matter cannot be established.

2. Claims 89-106 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents:

   D1: WO 96/08565
   D2: WO 2004/045532

2. D1 describes the antibody MC3, variants of said antibody, including humanized versions of it. Methods for the humanization of murine monoclonal antibodies is mentioned in D1. Moreover, the use of these humanized antibodies in diagnostic, prognostic or therapeutic applications is described in D1 (abstract; page 13, line 6 to page 25; page 31, line 24 to page 35, line 24; examples 1-13).

   MC3 is an antibody which binds to a linear epitope of M-CSF and inhibits its activity. Thus, in view of D1, the subject-matter of claims 5-8, 77-106, 110-124 and 141-153 is not novel (Article 33(2) PCT).

3. The murine antibody RX1 having the heavy chain amino acid sequence of SEQ ID No.2 and the light chain amino acid sequence of SEQ ID No.4 is known in the art. Humanization and human engineering methods of antibodies are well-known in the

art (see e.g. D1 or D2). Thus, the skilled person, aware of the commercially available antibodies specifically binding to M-CSF, such as the RX1 antibody, and aware of the connection between M-CSF and osteoclast formation and cancer metastasis, by applying common knowledge and routinely used technics, would automatically and in a straightforward manner come to the subject-matter of claims 3, 4, 12-76, 107-109, 125-140 and 154-161. Therefore, said subject-matter is not inventive (Article 33(3) PCT).

4. The attention of the Applicant is drawn to the fact that a reply to this opinion is only expected if he intends to file a Chapter II demand.

VI. Certain documents cited

Certain published documents (Rule 70.10)

1. WO 2004/045532

2. GB-A-2 405 873

p 749

525
523

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 03/104 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Juan Pablo Piedrahita Aguilera, Traductor e Intérprete Oficial debidamente reconocido de conformidad con el Certificado de Idoneidad Profesional No. 0045 expedido por la Universidad Nacional de Colombia.

(Se traducen un Poder otorgado por Chiron Corporation, un Certificado Notarial y la Apostilla No. 152057, todo escrito en inglés).

CLARKE, MODET & CO. COLOMBIA

PODER

Yo (Nosotros) el (los) suscrito(s), representante(s) legal(es) de Chiron Corporation, sociedad organizada y existente bajo las leyes de Delaware y en desempeño en la actualidad de su actividad comercial, domiciliada en 4560 Horton Street, Emeryville, CA, 94608, EE.UU., por el presente otorgamos Poder a DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMÁN, identificada con cédula de ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá y Tarjeta Profesional 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, identificada con Tarjeta Profesional 36448 y cédula de ciudadanía No 40.017.374 de Tunja, con domicilio en Santafé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre de la otorgante la representen ante cualquier entidad, autoridad y/o perso

TRADUCCION OFICIAL No. 03/104
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

NOTARIA 36 DE BOGOTA
Como fiel copia de la escritura 36 de este círculo hago constar que este copia coincide con el documento original presentado para su autenticación
04 AGO 2006
WILSON ORLANDO VELASQUEZ
NOTARIO 36 ENCARGADO

523
524

las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualesquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: Patentes de Invención, Modelos de Utilidad; Diseños Industriales, variedades vegetales, Marcas, Lemas, Nombres y Enseñas Comerciales y Denominaciones de Origen; así como sus renovaciones, prórrogas, traspasos, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

2) Solicitar, tramitar, obtener, y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how o crédito mercantil.

3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, cesiones, traspasos, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reivindicaciones, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrán intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía, adoptar

TRADUCCION OFICIAL No. 03/104
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD DAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

VALE
Por Derechos
Como Notaría 34 de este Círculo
Certifica que esta copia coincide con
el original presentado
Su apariencia
04 AGO 2006
JULIETA OTALORA VELASQUEZ
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

524
525

o juicios promovidos por el mandante o contra él.

5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.

6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, aceptar cláusulas compromisorias, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.

7) Ratificar o no la agencia oficiosa.

8) Así mismo facultamos a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en Chiron Corporation, Emeryville, CA, hoy día 19 de Marzol, 2003.

Por: (Firmado) Steven W. Collier

Secretario Asistente

Chiron Corporation

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es una SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en El Salvador, México, Estados Unidos de América y Venezuela)

El suscrito Notario CERTIFICA que:

NOTARIA 36 BOGOTA D.C.
Como Notaria 36 de este Distrito hago constar que esta copia corresponde con el documento original presentado para su autenticación
04 AGO 2006
WILLIAM OLMEDO VELASQUEZ H.
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

TRADUCCION OFICIAL No. 03 / 124
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FFS
526

1). Steven W. Collier, (nombre de quien firma el poder), mayor de edad y domiciliado en Oakland CA, ,suscribió el anterior documento.

2) El otorgante le es conocido personalmente y tiene capacidad para firmar el documento.

3) El otorgante ha suscrito el anterior documento en su calidad de Secretario Asistente de la persona jurídica Chiron Corporation.

4) La mencionada persona jurídica con domicilio comercial en Emeryville CA, está debidamente constituida, tiene actualmente existencia legal y el fin para el cual se otorga este poder se encuentra dentro de su objeto social.

5) El otorgante tiene en efecto la capacidad referida y su representación es legal y está autorizado para otorgar este poder.

6) Fundamento las certificaciones 3), 4) y 5) en los documentos auténticos que para tal fin me fueron exhibidos.

(Firmado) Elissa M. Nash

Notario Público

(Sello Notarial a Tinta: Elissa M. Nash, Comisión No. 1262878, Notario Público, California, Condado de Alameda, Mi Comisión Vence Mayo 10, 2004)

Nota: El Consulado de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia

NOTARIA 38 BOGOTA D.C.
Fiel copia del documento que antecede, coincide con el documento original presentado para su autenticación
04 AGO 2006
WILLIAM OSORIO VELASQUEZ
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

03/104
TRADUCCION OFICIAL No.
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia de: 1) la existencia legal de la sociedad, 2) que cumple actualmente con su objeto social, y 3) que la persona o personas que otorgan este poder están facultadas para hacerlo. El Cónsul también certificará que los tuvo a la vista los documentos que prueban y acreditan tales circunstancias.

Estado de California

(Sello Pre-Impreso)

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5 1961)

1. *País: Estados Unidos de América*

   Este documento público

2. *Ha sido firmado por Elissa M. Nash*

3. *Actuando en calidad de Notario Público, Estado de California*

4. *Lleva el sello/estampilla de Elissa M. Nash, Notario Público, Estado de California*

CERTIFICADO

5. *En Sacramento*

6. *El 11 de Abril del 2003*

7. *Por el Sub-Secretario de Estado, Estado de California*

NOTARIA 36 DE BOGOTA D.C.
Como Notario 36 de Bogotá D.C. Certifico hago constar que esta copia es igual al documento original presentado para su autenticación
04 AGO 2006
WILSON ALBERTO VELASQUEZ R.
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

TRADUCCION OFICIAL No. 03/104
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

527
528

8.	*No. 152057*
9.	*Sello/Estamplilla*

(Sello de Oblea del Estado de California, Sello a tinta del Secretario de Estado)

(Sello Redondo a Tinta del Secretario de Estado)

10. Firma (Firmado)

Kevin Shelley

Secretario de Estado

Por (Firmado) Ilegible

NP-24 A (Rev 1-03) osp 03 74700

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, Mayo 27, 2003.

03/104

TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

NOTARIA 36 [illegible] D.C.
Como Notaria 36 de este Circulo hago constar que esta copia coincide con el documento original presentado para su autenticación
04 AGO 2006
WILLIAM OLAYA VELASQUEZ
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

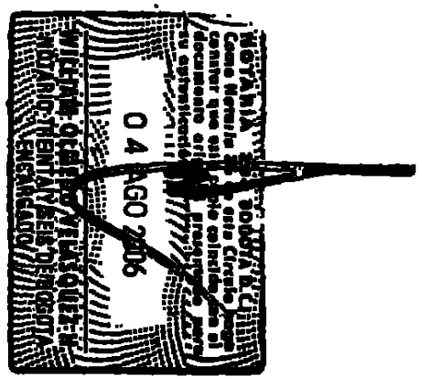
033074

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO PRESENTADA LAS FIRMAS

EL SUSCRITO JEFE DE LEGALIZACIONES

2003 JUN -6 A 10:35

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



RZY
529

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document

2. *has been signed by Elissa M. Nash*

3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*

4. *bears the seal/stamp of Elissa M. Nash, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*

6. *the 11th day of April 2003*

7. *by Deputy Secretary of State, State of California*

8. *No. 152057*

9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

KEVIN SHELLEY
Secretary of State

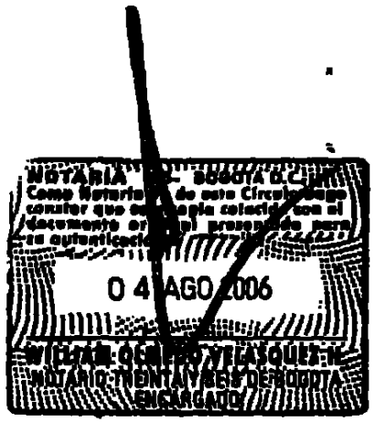
BY _____

04 AGO 2003

NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

NP-84 A (REV. 1-03)

AGUILERA
TRADUCCION
JUAN PABLO
TRADUCTOR OFICIAL
IDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (confarimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
4) Entablar acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, recobro de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella) .
5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

TRADUCCION OFICIAL No. 03 / 104
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Legal representative(s) of Chiron Corporation

An organization existing under the laws of Delaware

And in present execution of its business activity, domiciled at 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608, US

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above- mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
5) To register domain names before the competent entity.
6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
7) To ratify or not the officious agency.
8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such sustitutions.

Granted and signed at Chiron Corporation

on this 19th day of March of 2003

Firma / signature Steven W. Collier
Assistant Secretary
Chiron Corporation

NOTARIA 36 DE BOGOTA D.C.
Como Notaria 36 de este Circulo hago constar que esta copia coincide con el documento original presentado para autenticación.
08 AGO 2006
WILLIAM OSWALDO VELASQUEZ H.
NOTARIO TREINTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los días del mes de de , el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado _____ _____ firmó de su puño y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de_____ de la persona jurídica _____ _____

4. La citada persona jurídica con sede en _____ _____está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

_____
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los días del mes de de , el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____ _____ firmó en su presencia el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

_____
Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA O POR APOSTILLA

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This day of
The undersigned Notary CERTIFIES that:

1. Steven W. Collier
(name of the person who signs the power of attorney)

of legal age and domiciled in Oakland, CA set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of Assistant Secretary of the juridical person Chiron Corporation

4. The mentioned juridical person with place of business in Emeryville, CA is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in f act the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

E. Nash
Notary Public
Elissa M. Nash

ELISSA M. NASH
Commission # 1328896
Notary Public - California
Alameda County
My Comm. Expires May 10, 2006

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is INDIVIDUALS)

On this day of
The undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at _____ _____ signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

_____
Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually [illegible] and that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documentary evidence of such circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY APOSTILLE.

NOTARIA 38 BOGOTA D.C.
Carrera 53 No. 106-80 Barrio Cedritos Teléfono 6 [illegible]
04 AGO 2006
ALVARO VELASQUEZ H.
NOTARIO CUARENTA Y SEIS DE BOGOTA
ENCARGADO

TRADUCCION OFICIAL
JUAN PABLO PIEDRAHITA
TRADUCTOR E INTERPRETE
C. IDONEIDAD
COLOMBIA

530

531

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-076955- -00000-0000
Fec: 2006-06-04 16:06:41 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTE(YI
Cve: 378 FASCNACIONALI
Act 411 PRESENTACION Entins: 529

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

07/08/06

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capitulo I. ☐ Capitulo II.

2) SOLICITANTE (71)	Nombre: 1. CHIRON CORPORATION 2. XOMA TECHNOLOGY LTD. Dirección: 1. Intellectual Property, R-338, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 USA; 2. Clarendon House, 2 Church Street, Hamilton HM11 (BM) Nacionalidad o. domicilio: 1. Emeryville, CA, Estados Unidos; 2. Hamilton, Bermuda Lugar de constitución: 1. Emeryville, California, USA; 2. Hamilton, Bermuda **Teléfono:** **Fax:** **E. Mail:**	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ **NÚMERO:** 41.654.882 **TP:** 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	**Nombre: 1. LIU, Cheng; 2. ZIMMERMAN, Deborah,Lee; 3. HARROWE, Gregory, Martin; 4. KOTHS, Kirston; 5. KAVANAUGH, William, Michael; 6. LONG, Li; 7. CALDERON-CACIA, Maria; 8. HORWITZ, Arnold, H.** **Dirección: 1. a 7: C/o Chiron Corporation, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662, USA; 8. 2720 Lakeview Drive, San Leandro, CA 94577, USA** **Nacionalidad o Domicilio: 1-5 Estadounideses; 6. Canadiense; 7-8 Estadounidenses**	

5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2005/000546 Fecha: ENERO 6, 2005

Publicación Internacional No. WO 2005/068503 A2 Fecha: JULIO 28, 2005

6)Título (54) ANTICUERPO MONOCLONAL M-CSF ESPECÍFICO Y USOS DE ÉSTOS

7) Clasificación Internacional: C07K 16/00

8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐	**33) País de Origen**	**(32) Fecha**	**(31) Número de Solicitud**
	Estados Unidos	**Enero 7, 2004**	**60/535,181**
	Estados Unidos	**Junio 2, 2004**	**60/576,417**

9) Comprobante de pago N°: 06-52,009 Fecha: Julio 10 2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

67

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de no murino que compite con un anticuerpo monoclonal RX1 para unir al M-CSF por más del 75%, en donde dicho anticuerpo monoclonal RX1 comprende las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena liviana establecidas en las ID de SEC Nos: 2 y 4, respectivamente.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que se une específicamente al mismo epítopo de M-CSF como un anticuerpo monoclonal RX1, en donde dicho anticuerpo monoclonal RX1 comprende las secuencias de aminoácido de cadena pesada y cadena liviana establecidas en la ID de SEC Nos: 2 y 4, respectivamente.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2 que une un epítopo de M-CSF que comprende al menos 4 residuos contiguos de las ID de SEC No: 120 o 121.

4. El anticuerpo de la reivindicación 2 que une un epítopo de M-CSF que comprende las ID de SEC No: 120 o 121.

5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que es un anticuerpo monoclonal.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-076955- -00000-0000
Fec: 2006-08-04 16:06:41 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Cve: 378 FASCINACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 529

532
533

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- Descripción de la invención [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha 04 AGO. 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

533

534

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	06 76955
	Solicitud internacional	US2005/000546
	Fecha inicio fase nacional	07/08/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11203

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene las copias de los documentos en que constan las cesiones de los derechos a la patente de los inventores a los solicitantes o a sus causantes. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado por la sociedad XOMA TECHNOLOGY LTD., con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 06 OCT. 2006
aalvarado