

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 342 820**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2002 PCT/US2002/20181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2003 WO03002713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2002 E 02749660 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.07.2020 EP 1409016**

54 Título: **Anticuerpos del OPGL**

30 Prioridad:

26.06.2001 US 301172 P

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

14.04.2021

73 Titular/es:

**AMGEN FREMONT INC. (50.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US y
AMGEN INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOYLE, WILLIAM J.;
MARTIN, FRANCIS H.;
CORVALAN, JOSE R. y
DAVIS, GEOFFREY C.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 342 820 T5

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos del OPGL

Campo del invento

5 El presente invento se refiere a anticuerpos que se unen a un ligando de osteoprotegerina (OPGL). También se describen las composiciones y los procedimientos de tratamiento de enfermedades óseas, tales como la osteoporosis, la pérdida de hueso provocada por la artritis, la enfermedad de Paget y la osteopenia.

Antecedentes del invento

10 El tejido óseo sostiene el cuerpo e incluye minerales (como calcio y fósforo), una matriz de proteínas colagenosas y no colagenosas, y células. El tejido óseo vivo registra un equilibrio dinámico entre la formación ósea, denominada deposición, y la disminución ósea, denominada reabsorción. Tres tipos de células que se encuentran en los huesos (osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) participan en este equilibrio. Los osteoblastos promueven la formación de tejido óseo, mientras que los osteoclastos están asociados con la reabsorción. La reabsorción, o la disolución de la matriz ósea y los minerales, es un proceso rápido y eficiente en comparación con la formación ósea, y puede liberar cantidades importantes de minerales de los huesos. Los osteoclastos participan en la regulación de la remodelación normal del tejido esquelético y en la reabsorción inducida por las hormonas. Por ejemplo, la reabsorción se estimula por la secreción de la hormona paratiroidea en respuesta a una reducción de las concentraciones de iones de calcio en los líquidos extracelulares. Por lo contrario, la inhibición de la reabsorción es una función de la calcitonina. Por otra parte, los metabolitos de vitamina D alteran la sensibilidad del hueso a la hormona paratiroidea y a la calcitonina.

20 El ligando de osteoprotegerina (OPGL), que pertenece a la familia de las citoquinas TNF, promueve la formación de osteoclastos al unirse al activador del receptor del NF-KB (RANK, también denominado receptor de diferenciación y activación de osteoclastos —ODAR, por sus siglas en inglés). La osteoprotegerina (OPG), por otra parte, inhibe la formación de osteoclastos aislando el OPGL e impidiendo la asociación del OPGL con el ODAR. De este modo, la cantidad de OPGL asociada con ODAR se correlaciona con el equilibrio entre la deposición y reabsorción óseas.

25 Tras la madurez esquelética, la cantidad de hueso del esqueleto refleja el equilibrio (o el desequilibrio) de la formación y reabsorción óseas. La masa ósea máxima se alcanza tras la madurez esquelética, antes de cumplir los cuarenta años. Entre los cuarenta y los cincuenta años, el equilibrio varía y domina la reabsorción ósea. La inevitable reducción de masa ósea con el paso de los años comienza antes en las mujeres que en los hombres, y se ve claramente intensificada tras la menopausia en algunas mujeres (principalmente las de ascendencia caucásica y asiática).

30 Por lo general, por osteopenia se entiende cualquier reducción de la masa ósea por debajo de los niveles normales. Esto se puede deber a una reducción del ritmo de síntesis ósea, a un incremento del ritmo de destrucción ósea o a ambas cosas. Una forma frecuente de osteopenia es la osteoporosis primaria, también denominada osteoporosis postmenopáusica o senil. Esta forma de osteoporosis es consecuencia de la pérdida universal de hueso con la edad y, por lo general, se debe a un incremento de la reabsorción ósea con un ritmo normal de formación ósea. Muchas mujeres de raza blanca de los Estados Unidos desarrollan una osteoporosis sintomática. Existe una relación directa entre la osteoporosis y la incidencia de las fracturas de cadera, femorales, cervicales e intertrocanterías en las mujeres a partir de los 45 años. Los hombres mayores pueden desarrollar una osteoporosis sintomática entre los 50 y los 70 años. En determinadas circunstancias, la osteoporosis puede ser consecuencia de un aumento de los niveles o de la actividad del OPGL. Por ello, sería útil tener moléculas que puedan regular la actividad del OPGL en la osteoclastogénesis.

40 Se han identificado diversos factores que pueden contribuir a la osteoporosis postmenopáusica y senil. Entre ellos se incluyen la alteración de los niveles hormonales típica del envejecimiento y un consumo insuficiente de calcio atribuido al descenso de la absorción intestinal de calcio y otros minerales. Determinados tratamientos han incluido la terapia hormonal o suplementos dietéticos, en un intento de retardar el proceso. Más recientemente, han surgido los agentes antirreabsortivos, como los bifosfonatos, y los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) para la prevención y el tratamiento de la reducción de la masa ósea. Así pues, puede resultar útil combinar estos tratamientos con moléculas que puedan regular la actividad del OPGL para el tratamiento de determinados trastornos osteopélicos.

50 Tsukii y col. (*Biochemical and Biophysical Research Communications* (1998), vol. 246, páginas 336-341) revelan un anticuerpo policlonal dirigido contra el ODF murino (-OPGL, RANKL) que resulta efectivo para inhibir la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea *in vitro*. No se reveló una eficacia *in vivo*, es decir, un efecto prolongado (durante varias semanas).

Exposición del invento

El presente invento se define en las reivindicaciones siguientes.

55 En el presente documento, se describe un anticuerpo, compuesto de una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 2 y la cadena ligera comprende

la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 4.

5 En determinadas realizaciones, el invento proporciona un anticuerpo, compuesto de una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una región variable compuesta por la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13 y donde la cadena ligera comprende una región variable compuesta por la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14.

El invento proporciona un anticuerpo, compuesto de una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma.

10 En determinadas realizaciones, el invento proporciona un anticuerpo, compuesto de una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una región variable compuesta por la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma.

El invento proporciona un anticuerpo, compuesto de una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.

15 En determinadas realizaciones, el invento proporciona un anticuerpo, compuesto de una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende una región variable compuesta por la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma.

20 En determinadas realizaciones, el invento proporciona un anticuerpo, compuesto de una cadena pesada y una cadena ligera, (a) donde la cadena pesada comprende una primera región variable y donde la primera región variable comprende una secuencia que se corresponde, al menos en un 90%, con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13, y (b) donde la cadena ligera comprende una segunda región variable y donde la segunda región variable comprende una secuencia que se corresponde, al menos en un 90%, con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14, y (c) donde el anticuerpo interactúa con un ligando de osteoprotegerina (OPGL).

25 En determinadas realizaciones, la primera región variable comprende una secuencia que se corresponde, al menos en un 95%, con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable comprende una secuencia que se corresponde, al menos en un 95%, con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14.

En determinadas realizaciones, la primera región variable comprende una secuencia que se corresponde, al menos en un 99%, con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable comprende una secuencia que se corresponde, al menos en un 99%, con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14.

30 El hallazgo ofrece una cadena pesada, compuesta de la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO:2 o un fragmento de la misma. En determinadas realizaciones, el invento proporciona una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13.

35 El hallazgo proporciona una cadena ligera, compuesta por la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO:4 o un fragmento de la misma; en determinadas realizaciones, el invento proporciona una cadena ligera compuesta por la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14.

En determinadas realizaciones del hallazgo, se proporcionan anticuerpos de cadena simple. En determinadas realizaciones del invento, se proporcionan anticuerpos Fv de cadena simple. En determinadas realizaciones del invento, se proporcionan anticuerpos Fab. En determinadas realizaciones del invento, se proporcionan anticuerpos (Fab')₂.

40 En determinadas realizaciones, se proporciona una preparación farmacéutica compuesta de un anticuerpo del invento. En determinadas realizaciones, la preparación farmacéutica puede estar compuesta de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo del OPGL.

45 En determinadas realizaciones, la preparación farmacéutica puede comprender un anticuerpo del OPGL y al menos un agente terapéutico seleccionado entre un factor morfogénico óseo; factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), un inhibidor de la interleucina 1 (IL-1), IL-1ra, Kineret™ (anakinra), un inhibidor del TNFα, un receptor de TNFα soluble, Enbrel™ (etanercept), un anticuerpo del TNFα, Remicade™ (infliximab), un anticuerpo D2E7, una hormona paratiroidea, un análogo de una hormona paratiroidea, una proteína relacionada con la hormona paratiroidea, un análogo de una proteína relacionada con la hormona paratiroidea, una prostaglandina, un bifosfonato, un alendronato, fluoruro, calcio, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un inhibidor de COX-2, Celebrex™ (celecoxib),
50 Vioxx™ (rofecoxib), un inmunosupresor, metotrexato, leflunomida, un inhibidor de la serin-proteasa, un inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores (SLPI), un inhibidor de IL-6, un anticuerpo de IL-6, un inhibidor de IL-8, un anticuerpo de IL-8, un inhibidor de IL-18, una proteína de enlace de IL-18, un anticuerpo de IL-18, un modulador de la enzima de conversión de la interleucina-1 (ICE), un factor de crecimiento fibroblasto (FGF), un modulador del FGF, un antagonista del PAF, un factor de crecimiento queratinocítico (KGF), una molécula relacionada con el KGF, un modulador del KGF;
55 un modulador de la metaloproteinasa de matriz (MMP), un modulador de la sintasa del óxido nítrico (NOS), un

modulador del receptor de glucocorticoides, un modulador del receptor de glutamato, un modulador de los niveles de lipopolisacáridos (LPS), una noradrenalina, un mimético de noradrenalina, y un modulador de noradrenalina.

5 En determinados aspectos de la divulgación, su anticuerpo es para un procedimiento de tratamiento de trastornos osteopénicos, que comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente efectiva del anticuerpo. En determinados aspectos de la divulgación, la preparación farmacéutica del invento es para un procedimiento de tratamiento de un trastorno osteopénico consistente en la administración de la misma.

En determinados aspectos de la divulgación, la preparación farmacéutica es para un procedimiento de tratamiento de una enfermedad inflamatoria con pérdida ósea en un paciente, consistente en la administración de la misma.

10 En determinados aspectos de la divulgación, la preparación farmacéutica es para un procedimiento de tratamiento de una enfermedad autoinmune con pérdida ósea en un paciente, consistente en la administración de la misma.

En determinados aspectos de la divulgación, la preparación farmacéutica del invento es para un procedimiento de tratamiento de la artritis reumatoide en un paciente, consistente en la administración de la misma.

En determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un procedimiento para detectar el nivel de OPGL en una muestra biológica, consistente en poner en contacto la muestra con un anticuerpo del invento.

15 **Descripción breve de las figuras**

La Figura 1 muestra una secuencia de cDNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo α OPGL-1 (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo α OPGL-1 (SEQ ID NO: 2).

20 La Figura 3 muestra una secuencia de cDNA que codifica la cadena ligera del anticuerpo α OPGL-1 (SEQ ID NO: 3).

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo α OPGL-1 (SEQ ID NO: 4)

La Figura 5 muestra un diagrama esquemático del plásmido de expresión de la cadena ligera de tipo kappa del α OPGL-1, α OPGL-1-Kappa/pDSRa19.

25 La Figura 6 muestra un diagrama esquemático del plásmido de expresión de la cadena pesada del α OPGL-1 IgG2 , α OPGL-1-Kappa/pDSRa19.

La Figura 7 muestra una unión dependiente de la dosis del α OPGL-1 a las placas EIA revestidas de OPGL.

La Figura 8 muestra la unión específica de α OPGL-1 al OPGL unido a la membrana

La Figura 9 muestra la inhibición de la unión del α OPGL-1 a las placas EIA revestidas de OPGL mediante una forma soluble de OPGL.

30 La Figura 10 muestra la unión específica de α OPGL-1 a las placas EIA revestidas de OPGL.

La Figura 11 muestra la inhibición dependiente de la dosis de la formación de osteoclastos mediante α OPGL-1.

La Figura 12 muestra la inhibición dependiente de la dosis de la unión de OPGL a ODAR mediante α OPGL-1.

La Figura 13 muestra los perfiles del tiempo medio de concentración sérica tras la administración de una única dosis de α OPGL-1 a macacos cangrejeros.

35 La Figura 14 muestra el cambio porcentual medio de la concentración sérica de N-Tx tras la administración de una única dosis de α OPGL-1 a macacos cangrejeros.

La Figura 15 muestra el cambio porcentual medio de la concentración de N-Tx en orina tras la administración de una única dosis de α OPGL-1 a macacos cangrejeros.

40 La Figura 16 muestra los perfiles del tiempo de concentración sérica positiva y negativa del anticuerpo tras la administración de una única dosis de α OPGL-1 a macacos cangrejeros.

La Figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo α OPGL-1 (SEQ ID NO: 13).

La Figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo α OPGL-1 (SEQ ID NO: 14).

45 La Figura 19 muestra el proceso de cultivo celular para la producción de α OPGL-1.

La Figura 20 muestra el cambio porcentual de calcio sérico tras la administración de una única dosis de α OPGL-1 a macacos cangrejeros.

La Figura 21 muestra el cambio porcentual medio de fosfatasa alcalina tras la administración de una única dosis de α OPGL-1 a macacos cangrejeros.

50 **Descripción detallada de determinadas realizaciones preferentes**

Los títulos de las secciones empleados en el presente documento tienen fines exclusivamente organizativos y no se deberá interpretar que limitan el objeto descrito.

Definiciones

55 Pueden utilizarse técnicas estándar para el DNA recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo y la transformación de tejidos (tales como la electroporación y la lipofección). Se pueden emplear técnicas de purificación y reacciones enzimáticas de conformidad con las especificaciones del fabricante, con la práctica habitual en el campo o con lo descrito en el presente documento. Por lo general, las técnicas y los procedimientos mencionados se pueden

realizar de conformidad con procedimientos convencionales bien establecidos en el campo y como se describe en varias referencias generales y más específicas mencionadas y debatidas en la presente especificación. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). A menos que se faciliten definiciones específicas, los procedimientos de laboratorio y las técnicas de química analítica, química orgánica sintética, química medicinal y farmacéutica, así como las nomenclaturas relacionadas, mencionados en el presente documento son los habituales y consolidados en el campo. Se pueden utilizar técnicas estándar para la síntesis química, el análisis químico, la preparación farmacéutica, la formulación, la distribución y el tratamiento de pacientes.

Los siguientes términos del presente documento, a menos que se indique lo contrario, se interpretarán con el significado que se recoge a continuación:

El término «polinucleótido aislado» utilizado en el presente significará un polinucleótido de origen genómico, cDNA, o sintético, o alguna combinación de los mismos, cuando, en virtud de su origen, el «polinucleótido aislado» (1) no esté asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que el «polinucleótido aislado» se encuentre por naturaleza, (2) esté unido a un polinucleótido al que no esté unido por naturaleza o (3) no ocurra por naturaleza como parte de una secuencia más amplia.

El término «proteína aislada» utilizado en el presente significa una proteína codificada por cDNA, RNA recombinante o de origen sintético, o una combinación de los mismos, que (1) se encuentre libre al menos de algunas proteínas con las que se debería encontrar normalmente, (2) se encuentre fundamentalmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo de la misma especie, (3) esté expresada en una célula de una especie diferente o (4) no ocurra por naturaleza.

El término «polipéptido» se utiliza en el presente como un término genérico para referirse a proteínas nativas, o secuencias con eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más de los aminoácidos de la secuencia nativa. El término «polipéptido» comprende también el α OPGL-1 (descrito más adelante, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4), o secuencias con eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más de los aminoácidos de un α OPGL-1. De acuerdo con determinadas realizaciones, el invento comprende la cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina humana representada por la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) y la cadena ligera de la molécula de inmunoglobulina humana representada por la Figura 4 (SEQ ID NO: 4).

El término «presente naturalmente» aplicado a un objeto en el presente documento se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar por naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos que está presente en un organismo (incluyendo los virus) que se puede aislar de su fuente natural y que no ha sido modificada de forma intencionada por el hombre en el laboratorio o, dicho de otro modo, que está presente naturalmente.

El término «unido funcionalmente» utilizado en el presente se refiere a componentes que mantienen una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, una secuencia de control «unida funcionalmente» a una secuencia de codificación está unida de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término «secuencia de control» utilizado en el presente se refiere a secuencias de polinucleótidos que pueden efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación a las que están unidas. La naturaleza de estas secuencias de control puede variar dependiendo del organismo anfitrión. De acuerdo con determinadas realizaciones, las secuencias de control de las eucariotas pueden incluir el promotor, el sitio de unión ribosomal y la secuencia de terminación de la transcripción. De acuerdo con determinadas realizaciones, las secuencias de control de las eucariotas pueden incluir promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. En determinadas realizaciones, las «secuencias de control» pueden incluir secuencias líder y/o secuencias asociadas de fusión.

El término «polinucleótido» utilizado en el presente significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud. En determinadas realizaciones, las bases pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquiera de estos dos tipos de nucleótidos. El término incluye las formas de cadena simple y cadena doble de DNA.

El término «oligonucleótido» utilizado en el presente incluye nucleótidos presentes naturalmente o modificados, unidos por uniones de oligonucleótidos presentes naturalmente o de forma no natural. Por lo general, los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden una longitud de 200 bases o inferior. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos tienen entre 10 y 60 bases de longitud. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos tienen entre 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 y 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena simple o doble, por ejemplo para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos del invento pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

El término «nucleótidos presentes naturalmente» incluye ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. El término «nucleótidos modificados» incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término «uniones de oligonucleótidos» incluye uniones de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforaselenoato, fosforadiselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato, fosforamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche y col. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec y col. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein y col. Nucl.

Acids Res. 16:3209 (1988); Zon y col. *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon y col. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec y col. U.S. Pat. No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990) An oligonucleotide can include a label for detection.

- 5 La identidad y similitud de los relacionados y polipéptidos se pueden calcular fácilmente por procedimientos conocidos. Estos procedimientos incluyen, a título meramente enunciativo, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991), y Carillo y col., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988).

15 Los procedimientos preferentes para determinar la identidad están diseñados para conseguir la máxima correspondencia entre las secuencias testadas. Los procedimientos para determinar la identidad se describen en programas informáticos a disposición del público. Los procedimientos preferentes de los programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, a título meramente enunciativo, el paquete del programa CGC, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucl. Acid. Res.*, 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul y col., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está a disposición del público en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) estadounidense y otras fuentes (*BLAST Manual*, Altschul y col. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul y col, *supra* (1990)). También se puede utilizar el conocido algoritmo de Smith-Waterman para determinar la identidad.

20 Determinados programas de alineación para la alineación de dos secuencias de aminoácidos pueden resultar en la correspondencia solamente de una región corta de las dos secuencias y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de la secuencia muy elevada a pesar de que no exista ninguna relación significativa entre las dos secuencias en su longitud total. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el procedimiento de alineación seleccionado (programa GAP) resultará en una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

25 Por ejemplo, utilizando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que se va a determinar la identidad porcentual de la secuencia, para una correspondencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el «tramo de correspondencia» determinado por el algoritmo). En determinadas realizaciones, se utiliza una penalización de apertura de un gap (que se calcula como tres veces la diagonal media; la «diagonal media» es la media de la diagonal de la matriz de comparación en uso; la «diagonal» es la puntuación o el número asignado a cada una de las correspondencias de aminoácidos perfectas por la matriz de comparación en cuestión) y una penalización de extensión de un gap (que suele ser 1/10 veces la penalización de apertura de un gap), así como una matriz de comparación como la PAM 250 o BLOSUM 62 conjuntamente con el algoritmo. En determinadas realizaciones, el algoritmo también utiliza una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff y col, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5(3)(1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y col, *Proc. Natl Aca., Sel USA*, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

30 En determinadas realizaciones, los parámetros para la comparación de una secuencia de polipéptidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y col., *J. Mol. Biol*, 48:443-453 (1970);
Matriz de comparación: BLOSUM 62 from Henikoff y col., *supra* (1992);
Penalización del gap: 12 Penalización de longitud del gap: 4
Umbral de similitud: 0

35 El programa GAP puede ser útil con los parámetros mencionados. En determinadas realizaciones, los parámetros mencionados son los parámetros por defecto para las comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización por gaps finales) utilizando el algoritmo GAP.

40 Conforme se utilizan en el presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas se ajustan al uso convencional. Véase *Immunology-A Synthesis* (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los esteroisómeros (como los D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales como aminoácidos α -, aminoácidos α -disustituidos, aminoácidos N-alquil, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes apropiados de los polipéptidos del presente invento. Entre los ejemplos de aminoácidos no convencionales se incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (como 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos utilizada en el presente, la dirección de la izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección de la derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso estándar y convencional.

45 De igual modo, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos de

cadena simple es el extremo 5'; la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos de cadena doble se denomina la dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de las transcripciones de RNA naciente se denomina la dirección de transcripción; las regiones de la secuencia de la cadena de DNA que tengan la misma secuencia que el RNA y que sean 5' del extremo 5' de la transcripción de RNA se denominan «secuencias ascendentes»; las regiones de la secuencia de la cadena de DNA que tengan la misma secuencia que el RNA y que sean 3' del extremo 3' de la transcripción de RNA se denominan «secuencias descendentes».

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras pueden contener residuos de aminoácidos no presentes naturalmente, que son típicamente incorporados por la síntesis química de los péptidos y no por la síntesis de sistemas biológicos. Éstos incluyen peptidomiméticos y otras formas invertidas o inversas de fracciones de aminoácidos.

Los residuos presentes naturalmente se pueden dividir en clases, basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:

- 1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 4) básicos: His, Lys, Arg;
- 5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Estos residuos sustituidos se pueden introducir en regiones del anticuerpo humano que son homologas a las de anticuerpos no humanos, o en las regiones no homologas de la molécula.

Para realizar estos cambios, de acuerdo con determinadas realizaciones, se puede tener en cuenta el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de su carga. Son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofán (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para dotar de una función biológica interactiva a una proteína es bien entendida en el campo. Kyte y col, *J. Mol. Biol*, 157:105-131 (1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos con una puntuación o índice hidropático similar y que conservará una actividad biológica similar. En determinadas realizaciones, al implementar cambios basados en el índice hidropático, se incluye la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran dentro de ± 2 ; en determinadas realizaciones, se incluyen los que se encuentran dentro de ± 1 ; y en determinadas realizaciones, se incluyen los que se encuentran dentro de $\pm 0,5$.

También se entiende en El campo que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar efectivamente sobre la base de su hidrofiliidad, particularmente cuando el péptido o la proteína biológicamente funcional que se crea se va a utilizar en realizaciones inmunológicas, como en El caso que nos ocupa. En determinadas realizaciones, la hidrofiliidad media local máxima de una proteína, regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, mantiene una correlación con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); Usina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptofán (-3,4). En determinadas realizaciones, al implementar cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se incluye la sustitución de los aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad se encuentran dentro de ± 2 ; en determinadas realizaciones, se incluyen los que se encuentran dentro de ± 1 ; y en determinadas realizaciones, se incluyen los que se encuentran dentro de $\pm 0,5$. También se pueden identificar epítopes de secuencias de aminoácidos primarias sobre la base de la hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan «regiones centrales epitópicas».

En la Tabla 1 se recogen sustituciones de aminoácidos ejemplares

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala	Val, Leu, Me	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln

50

(continuación)

Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ácido diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, He	Leu
Phe	Leu, Val, He, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucina	Leu

- Un especialista cualificado podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido recogidas en el presente, utilizando técnicas bien consolidadas. En determinadas realizaciones, un especialista cualificado podrá identificar áreas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad, abordando regiones que no se consideran importantes para la actividad; en determinadas realizaciones, se pueden identificar residuos o porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En determinadas realizaciones, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura, se pueden someter a sustituciones de aminoácidos conservadoras sin destruir la actividad biológica o sin afectar negativamente a la estructura del polipéptido.
- 5 Por otra parte, un especialista cualificado puede revisar los estudios de estructura/función que identifican los residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. En vista de tal comparación, uno puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que se corresponden con los residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o la estructura en proteínas similares. Un especialista cualificado puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para estos residuos de aminoácidos importantes previstos.
- 10 Un especialista cualificado también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un especialista cualificado puede predecir la alineación de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, un especialista cualificado puede decidir no introducir cambios radicales en los residuos de aminoácidos que se prevé que se encuentran en la superficie de la proteína, dado que estos residuos pueden participar en importantes interacciones con otras moléculas. Por otra parte, un especialista cualificado puede generar variantes de prueba que contengan la sustitución de un solo aminoácido en cada residuo de aminoácidos deseado. Entonces las variantes pueden ser analizadas utilizando ensayos de actividad conocidos por los especialistas cualificados. Estas variantes se podrían utilizar para recopilar información acerca de las variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un determinado residuo de aminoácidos provoca la destrucción, una reducción no deseada o una inadecuación de la actividad, se deberán evitar las variantes con ese cambio. En otras palabras, basándose en la información recopilada con estos experimentos rutinarios, un especialista cualificado puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que se deberían evitar otras sustituciones, sea de forma aislada o en combinación con otras mutaciones.
- 20 Una serie de publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4):422-427 (1996), Chou y col., *Biochemistry*, 13(2):222-245(1974); Chou y col., *Biochemistry*, 113(2):211-222 (1974); Chou y col., *Adv. Enzymol. Relat. Area. Mol. Biol.*, 47:45-148 (1978); Chou y col., *Ann. Rev. Biochem.*, 47:251-276 y Chou y col., *Biophys. J.*, 26:367-384 (1979). Por otra parte, en la actualidad se dispone de programas informáticos capaces de ayudar a predecir la estructura secundaria. Un procedimiento de predicción de la estructura secundaria se basa en los modelos de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas con una identidad de la secuencia superior al 30%, o una similitud superior al 40%, suelen tener topologías estructurales similares. El reciente desarrollo de la base de datos estructural de las proteínas (PDB) ha permitido una predictibilidad mejorada de la estructura secundaria, incluido el número potencial de pliegues de la estructura de una proteína o
- 30
- 35

polipéptido. Véase Holm y col, *Nucl. Acid. Res.*, 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner y col, *Curr. Op. Struct Biol*, 7(3):369-376 (1997)) que hay un número limitado de pliegues en un determinado polipéptido o proteína y que una vez que se haya resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural resultará muchísimo más precisa.

5 Otros procedimientos para predecir la estructura secundaria incluyen el reconocimiento del plegamiento o «threading» (Jones, D., *Curr. Opin. Struct Biol*, 7(3):377-87 (1997); Sippi y col, *Structure*, 4(1):15-19(1996)), «análisis del perfil» (Bowie y col, *Science*, 253:164-170 (1991); Gribskov y col, *Meth. Enzym.*, 183:146-159 (1990); Gribskov y col., *Proc. Nat. Acad. Sel*, 84(13):4355-4358 (1987)), y «unión evolutiva» (véase Holm, *supra* (1999), y Brenner, *supra* (1997)).

10 En determinadas realizaciones, las variantes de anticuerpos incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o el tipo del sitio de glicosilación ha sido alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido asociado. En determinadas realizaciones, las variantes de la proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por (a secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde el residuo de aminoácidos designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácidos salvo prolina. La sustitución de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia ofrece un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena carbohidrato unida a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta
15 secuencia eliminarán una cadena de carbohidrato unida a N ya existente. También se produce una reorganización de las cadenas de carbohidrato unidas a N, en la que uno o más de los sitios de glicosilación unidos a N (típicamente los que están presentes naturalmente) son eliminados y se crean uno o más nuevos sitios unidos a N. Entre las variantes del anticuerpo preferentes adicionales se incluyen variantes de cisteína en las que uno o más de los residuos de cisteína se eliminan o se sustituyen por otro aminoácido (como serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos asociada. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos se deben replegar en una conformación biológicamente activa, como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Por lo general, las variantes de cisteína tienen menos residuos de cisteína que la proteína nativa y típicamente tienen un número par para minimizar las interacciones resultantes de las cisternas desparejadas.

25 De acuerdo con determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) modifican la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) modifican las afinidades de unión, y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de estos polipéptidos. De acuerdo con determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (en determinadas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservadoras) se pueden realizar en la secuencia presente naturalmente (en determinadas realizaciones, en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman los contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservadora típicamente no puede cambiar de forma sustancial las características estructurales de la secuencia asociada (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia asociada o que altera otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia asociada). Algunos ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en el campo se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C Branden and J Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton y col., *Nature* 354:105 (1991).

40 El término «fragmento de polipéptido» utilizado en el presente se refiere a un polipéptido que tiene una supresión de un amino-terminal y/o carboxi-terminal. En determinadas realizaciones, los fragmentos son al menos de 5 a 467 aminoácidos de largo. Se apreciará que en determinadas realizaciones, los fragmentos son al menos de 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de largo.

45 Por lo general, los análogos de péptidos se utilizan en la industria farmacéutica como fármacos no péptidos con propiedades análogas a las del péptido de plantilla. Estos tipos de compuestos no péptidos se denominan «miméticos de péptidos» o «peptidomiméticos». Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber and Freidinger *TINS* p.392 (1985); y Evans y col. *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Muchas veces estos compuestos se desarrollan con la ayuda de modelos moleculares informatizados. Los miméticos de péptidos que tienen una estructura similar a los péptidos útiles desde el punto de vista terapéutico se puede utilizar para producir un efecto profiláctico o terapéutico similar. Por lo general, los péptidos miméticos tienen una estructura similar a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tales como el anticuerpo humano, pero que tienen una o más uniones de péptidos opcionalmente sustituidas por una unión seleccionada entre: $-\text{CH}_2 \text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2 \text{SO}-$, por procedimientos consolidados en el campo. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consensuada por un D-aminoácido del mismo tipo (como D-lisina en lugar de L-lisina) se puede utilizar en determinadas realizaciones para generar péptidos más estables. Por otra parte, los péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consensuada o una variación de una secuencia consensuada sustancialmente idéntica se pueden generar por procedimientos conocidos en el campo (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar puentes de disulfuro intramoleculares que ciclizan el péptido.

60 «Anticuerpo» o «péptido/s del anticuerpo» se refiere a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto para una unión específica. En determinadas realizaciones, los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de DNA recombinante. En determinadas realizaciones, los fragmentos de unión se producen mediante el corte de los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, a título meramente

enunciativo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, y anticuerpos de cadena simple.

El término «cadena pesada» incluye cualquier polipéptido con una secuencia de la región variable suficiente para dotar de especificidad a un OPGL. El término «cadena ligera» incluye cualquier polipéptido con una secuencia de la región variable suficiente para dotar de especificidad a un OPGL. Una cadena pesada en toda su longitud incluye un dominio de la región variable, VH, y tres dominios de la región constante, C_H1, C_H2, y C_H3. El dominio VH se encuentra en el término amino del polipéptido y el dominio C_H3 se encuentra en el término carboxi. El término «cadena pesada», utilizado en el presente, comprende una cadena pesada en toda su longitud y fragmentos de la misma. Una cadena ligera en toda su longitud incluye un dominio de la región variable, VL, y un dominio de la región constante, CL. Al igual que en la cadena pesada, el dominio de la región variable de la cadena ligera se encuentra en el término amino del polipéptido. El término «cadena ligera», utilizado en el presente, comprende una cadena ligera en toda su longitud y fragmentos de la misma. Un fragmento Fab se compone de una cadena ligera y las regiones variables y C_H1 de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar una unión de disulfuro con la molécula de otra cadena pesada. Un fragmento Fab' contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante/entre los dominios C_H1 y C_H2, de forma que se puede formar una unión de disulfuro entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂. La región Fv comprende las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la ligera, pero carece de las regiones constantes. Los anticuerpos de cadena simple son moléculas Fv en las que las regiones variables de la cadena ligera y pesada se han conectado mediante un enlace flexible para formar una cadena de polipéptidos única que forma la región de unión del antígeno. Los anticuerpos de cadena simple se debaten con detalle en WO 88/01649 y las patentes estadounidenses n° 4.946.778 y 5.260.203.

Típicamente, en determinadas realizaciones, se entiende que un anticuerpo bivalente que no sea un anticuerpo «multiespecífico» o «multifuncional» tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos.

Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un ligando a un receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor al menos alrededor de un 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, o más (medido en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

El término «epítipo» incluye cualquier determinante de un polipéptido capaz de una unión específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. En determinadas realizaciones, los determinantes de los epítipos incluyen agrupaciones de moléculas con una superficie químicamente activa, como los aminoácidos, las cadenas laterales del azúcar, fosforilo, sulfonilo y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno a la que está unida un anticuerpo. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo está específicamente unido a un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo está específicamente unido a un antígeno cuando la constante de disociación es ≤ 1 nM; en determinadas realizaciones, cuando la constante de disociación es ≤ 100 nM; y en determinadas realizaciones, cuando la constante de disociación es ≤ 10 nM.

El término «agente» se utiliza en el presente para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto obtenido de materiales biológicos.

En el presente documento, los términos «etiqueta» o «etiquetado» se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un accesorio o aminoácido radiomarcado a un polipéptido de fragmentos de biotina que se pueden detectar mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contenga un marcador fluorescente o actividad enzimática que se pueda detectar mediante procedimientos ópticos o colorimétricos). En determinadas realizaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. En el campo se conocen y se pueden utilizar diversos procedimientos para el etiquetado de polipéptidos y glicoproteínas. Entre los ejemplos de etiquetas para los polipéptidos se incluyen, a título meramente enunciativo, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (como ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), etiquetas fluorescentes (como FITC, rodamina, lantánido-fósforos), etiquetas enzimáticas (como peroxidasa de rábano, (β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos biotinilados, quimioluminiscentes, epítipos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (como parejas de secuencias de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión metálicos, etiquetas de epítipos). En determinadas realizaciones, las etiquetas se asignan mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento esférico.

El término «muestra biológica», utilizado en el presente, incluye, a título meramente enunciativo, cualquier cantidad sustancia de una materia viva o anteriormente viva. Estas materias vivas incluyen, a título meramente enunciativo, humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Estas sustancias incluyen, a título meramente enunciativo, sangre, suero, orina, células, órganos, tejido, hueso, médula ósea, nódulos linfáticos y piel.

El término «trastorno osteopénico» incluye, a título meramente enunciativo, osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis del hueso lítico, periodontitis, artritis reumatoide y pérdida de hueso debido a la inmovilización. Además de estos trastornos óseos, se sabe que determinados cánceres aumentan la actividad de los osteoclastos e inducen la reabsorción de hueso, como el de mama, próstata y el mieloma múltiple. Ahora se sabe que estos cánceres producen factores que resultan en la sobreexpresión de OPGL en los huesos y conducen a un aumento de los recuentos de osteoclastos y de su actividad.

El término «agente farmacéutico o fármaco» utilizado en el presente se refiere a una preparación o compuesto químico capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra convenientemente a un paciente.

El término «modulador», utilizado en el presente, es un compuesto que cambia o altera la actividad o la función de una molécula. Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o descenso de la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En determinadas realizaciones, un modulador es un inhibidor que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Ciertas actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, a título meramente enunciativo, la afinidad a la unión, la actividad enzimática y la transducción de señales. Ciertos inhibidores ejemplares incluyen, a título meramente enunciativo, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en WO01/83525.

En el presente documento, «sustancialmente puro» significa una especie de objeto que es la especie predominante presente (es decir, desde el punto de vista molar es más abundante que cualquier otra especie individual de la preparación). En determinadas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una preparación en la que la especie del objeto comprende al menos el 50% (desde un punto de vista molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En determinadas realizaciones, una preparación sustancialmente pura comprenderá por encima del 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la preparación. En determinadas realizaciones, la especie del objeto está purificada hasta la homogeneidad esencial (la especie contaminante no se puede detectar en la preparación por procedimientos de detección convencionales) cuando la preparación consiste básicamente en una única especie macromolecular.

El término «paciente» incluye sujetos humanos y animales.

En esta aplicación, el uso del singular incluye el plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta aplicación, el uso de «o» significa «y/o» a menos que se indique lo contrario. Por otra parte, el término «incluyendo», así como otras formas, tales como «incluye» e «incluido», se utiliza a título meramente enunciativo. Por otra parte, términos como «elemento» o «componente» abarcan tanto elementos y componentes que comprenden una unidad como elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

El ligando de osteoprotegerina (OPGL), que pertenece a la familia de las citoquinas TNF (factor de necrosis tumoral) participa en la formación de osteoclastos. El aumento de la actividad del osteoclasto está relacionado con una serie de trastornos osteopénicos, entre los que se incluyen la osteoporosis postmenopáusica, la enfermedad de Paget, la metástasis del hueso lítico y la artritis reumatoide. Por lo tanto, una reducción de la actividad del OPGL puede provocar una disminución de la actividad del osteoclasto y, de este modo, reducir la gravedad de los trastornos osteopénicos. Tal como se desvela en el presente documento, los anticuerpos dirigidos al OPGL se pueden utilizar para tratar trastornos osteopénicos, incluyendo, a título meramente enunciativo, los mencionados anteriormente.

En determinadas realizaciones del presente invento, se proporciona un anticuerpo monoclonal totalmente humano del ligando de osteoprotegerina humano (OPGL). En determinadas realizaciones, se proporcionan las secuencias de aminoácidos que comprenden moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, particularmente secuencias que corresponden a las regiones variables. En determinadas realizaciones, se suministran secuencias correspondientes a regiones determinantes de la complementariedad (CDR), específicamente desde CDR1 hasta CDR3. De acuerdo con determinadas realizaciones, también se proporciona una línea de células de hibridoma que expresa esa molécula de inmunoglobulina y anticuerpo monoclonal. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano purificado del OPGL humano.

La capacidad de clonar y reconstruir el loci humano de tamaño megabase en cromosomas artificiales de levadura (YAC) y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un planteamiento para dilucidar los componentes funcionales de loci de gran tamaño o poco mapeados, así como para generar modelos útiles de enfermedad humana. Por otra parte, la utilización de esta tecnología para la sustitución del loci de ratón por sus equivalentes humanos podría proporcionar datos únicos sobre la expresión y regulación de los productos de genes humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en la inducción y progresión de la enfermedad.

Una aplicación práctica importante de esta estrategia es la «humanización» del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción del loci de la inmunoglobulina humana (Ig) en el ratón en el que los genes Ig endógenos han sido inactivados ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de células B. Por otra parte, esta estrategia podría ofrecer una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales totalmente humanos (Mabs). En determinadas realizaciones, se espera que los anticuerpos totalmente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas al ratón o los Mabs derivatizados del ratón y que aumenten, de este modo, en determinadas realizaciones, la eficacia y seguridad de los anticuerpos administrados. Los anticuerpos totalmente humanos se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, como la osteoporosis, la inflamación, la autoinmunidad y el cáncer, que puede implicar administraciones de anticuerpos repetidas.

Se pueden diseñar cadenas de ratón deficientes en producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos del

loci Ig humano en previsión de que ese ratón produzca anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humano pueden preservar la gran diversidad de genes variables, así como la conveniente regulación de la producción y expresión de anticuerpos. Al explotar la maquinaria del ratón para la selección y diversificación de anticuerpos y la ausencia de tolerancia inmunológica a las proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas cadenas del ratón puede producir anticuerpos de gran afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Utilizando la tecnología del hibridoma, se pueden producir y seleccionar los MAbs humanos específicos del antígeno con la especificidad deseada.

En determinadas realizaciones, se pueden utilizar regiones constantes de especies diferentes a la humana, junto con la región o regiones variables humanas.

10 Estructura del anticuerpo presente naturalmente

Por lo general, las unidades estructurales del anticuerpo presente naturalmente comprenden un tetrámero. Cada uno de estos tetrámeros se compone típicamente de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena «ligera» en toda su longitud (en determinadas realizaciones, unos 25 kDa) y una cadena «pesada» en toda su longitud (en determinadas realizaciones, unos 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena típicamente incluye una región variable de unos 100 a 110 o más aminoácidos que, por lo general, es responsable del reconocimiento de los antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena típicamente define una región constante que puede ser responsable de la función del efector. Normalmente, las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. En general, las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene diferentes subclases, entre las que se incluyen, a título meramente enunciativo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases entre las que se incluyen, a título meramente enunciativo, IgM1 e IgM2. IgA también está subdividida en subclases, entre las que se incluyen, a título meramente enunciativo IgA1 e IgA2. Por lo general, dentro de las cadenas pesadas y ligeras en toda su longitud, las regiones variable y constante están unidas por una región «J» de unos 12 aminoácidos o más. La cadena pesada también incluye una región «D» de unos 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology Ch J* (Paul, W., ed... 2ª ed. Raven Press, N Y (1939)). Las regiones variables de cada pareja de cadenas ligera/pesada forman típicamente el sitio de unión del antígeno.

Por lo general, las regiones variables muestran la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR de las dos cadenas de cada pareja típicamente se encuentran alineadas por las regiones marco, que pueden permitir la unión a un epítipo específico. Por lo general, entre el N-terminal y el C-terminal, las regiones variables de la cadena ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio normalmente se ajusta a las definiciones de *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia y col. Nature 342:877-883 (1989).

35 Anticuerpos biespecíficos o bifuncionales

Por lo general, un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadenas pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir por diversos procedimientos, entre los que se incluyen, a título meramente enunciativo, la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songvilai y Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny y col. J. Immunol. 148:1547-1553(1992).

Preparación de anticuerpos

De acuerdo con determinadas realizaciones, ciertos anticuerpos específicamente unidos a OPGL se incluyen en el invento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se pueden producir por inmunización con OPGL en toda su longitud, formas solubles de OPGL o un fragmento de los mismos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento pueden ser policlonales o monoclonales y/o anticuerpos recombinantes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento son anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, por inmunización de animales transgénicos capaces de producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la Solicitud Publicada PCT n° WO 93/12227).

En determinadas realizaciones, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de un α OPGL-1 pueden ser injertadas en regiones marco (FR) de la misma especie o de otra. En determinadas realizaciones, las CDR de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de α OPGL-1 pueden ser injertadas en FR humanas consensuadas. Para crear FR humanas consensuadas, en determinadas realizaciones, las FR de varias secuencias de aminoácidos humanas de cadena ligera o cadena pesada se alinean para identificar una secuencia de aminoácidos consensuada. En determinadas realizaciones, las FR de la cadena ligera o la cadena pesada de α OPGL-1 son sustituidas por las FR de una cadena ligera o una cadena pesada diferente. En determinadas realizaciones, los aminoácidos raros de las FR de las cadenas pesada y ligera de un α OPGL-1 no son sustituidos, mientras que el resto de los aminoácidos de las FR son sustituidos. Los aminoácidos raros son aminoácidos específicos que se encuentran en posiciones de las FR en las que no se suelen encontrar. En determinadas realizaciones, las regiones variables injertadas de un α OPGL-1 se pueden utilizar con una región

constante que sea diferente de la región constante de un α OPGL-1. En determinadas realizaciones, las regiones variables injertadas forman parte de un anticuerpo Fv de cadena simple. Los injertos de CDR se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n° 6.180.370, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, y 5.530.101.

5 De acuerdo con determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento se preparan mediante la utilización de un ratón transgénico con una porción sustancial del anticuerpo humano produciendo el genoma insertado, pero que muestra deficiencias en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Entonces este ratón es capaz de producir anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina humanos, y es deficiente en la producción de anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina murinos. Las tecnologías utilizadas para conseguir este resultado se revelan en las patentes, solicitudes y referencias recogidas en la presente especificación. En determinadas realizaciones, se pueden emplear procedimientos como los descritos en la Solicitud Publicada PCT n° WO 98/24893. Véase también Méndez y col. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

15 De acuerdo con determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales totalmente humanos específicos para el OPGL se producen como sigue. El ratón transgénico que contiene genes de inmunoglobulina humana es inmunizado con el antígeno de interés. Se obtienen las células linfáticas (como células B) del ratón que expresa los anticuerpos. Estas células recuperadas se fusionan con una línea de células de tipo mieloide para preparar líneas de células de hibridomas inmortales y estas líneas de células de hibridomas son estudiadas y seleccionadas para identificar las líneas de células de hibridomas que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En determinadas realizaciones, se proporciona la producción de una línea de células de hibridomas que genera anticuerpos específicos para el OPGL.

20 En determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento son producidos por las líneas de hibridomas AMG 6.1, AMG 6.4, AMG 6.5, AMG 7.1 y AMG 7.2. En determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento son producidos por las líneas de hibridomas AMG 6.1, AMG 6.4 y AMG 6.5. En determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento se unen al OPGL con una constante de disociación (Kd) de entre 0,23 y 0,29 nM aproximadamente. En determinadas realizaciones del invento, los anticuerpos se unen al OPGL con una Kd inferior a 0,23 nM.

25 En determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento son del isotipo IgG2. En determinadas realizaciones del invento, los anticuerpos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada IgG2 humana. En determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento han sido clonados para la expresión en células de mamífero; en determinadas realizaciones, las regiones variables de los anticuerpos están unidas a una región constante diferente a la región constante del isotipo IgG2.

30 En determinadas realizaciones, las modificaciones conservadoras de las cadenas pesada y ligera de α OPGL-1 (y las modificaciones correspondientes en los nucleótidos de codificación) producirán anticuerpos del OPGL con unas características químicas y funcionales similares a las del α OPGL-1. Por lo contrario, las modificaciones sustanciales en las características químicas y/o funcionales de α OPGL-1 se pueden introducir seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que se difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la columna molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo, con una conformación plana o helicoidal; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el conjunto de la cadena lateral.

35 Por ejemplo, una «sustitución de aminoácidos conservadora» puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo, de forma que se produzca un efecto escaso o nulo sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esa posición. Por otra parte, cualquier residuo nativo en el polipéptido también se puede sustituir por alanina, como ya se ha descrito anteriormente para la «mutagénesis de rastreo de alanina».

40 Las sustituciones de aminoácidos deseadas (sean conservadoras o no) pueden ser determinadas por especialistas cualificados en el momento en que se desee realizar dichas sustituciones. En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos se pueden utilizar para identificar residuos importantes de α OPGL-1 o para incrementar o reducir la afinidad de los anticuerpos al OPGL, descrita en el presente.

45 En determinadas realizaciones, los anticuerpos del presente invento se pueden expresar en líneas de células diferentes a líneas de células de hibridomas. En determinadas realizaciones, las secuencias que codifican determinados anticuerpos se pueden utilizar para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. De acuerdo con determinadas realizaciones, la transformación se puede realizar por cualquier procedimiento conocido para la introducción de polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo, el empaquetado del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y la transducción de una célula huésped al virus (o vector) o mediante procesos de transfección conocidos en el campo, como se ejemplifica en las patentes estadounidenses n° 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. En determinadas realizaciones, el procedimiento de transformación utilizado puede depender del huésped que se debe transformar. Los procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos en el campo e incluye, a título meramente enunciativo, la transfección mediada por dextrano, la precipitación de fosfato cálcico, la transfección mediada por polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, la encapsulación del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas y la microinyección directa de DNA en el núcleo.

Las líneas de células de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en el campo e incluyen, a título meramente enunciativo, muchas líneas de células inmortalizadas disponibles en la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo (ATCC), incluyendo, a título meramente enunciativo, las células de ovario de hámster chino (CHO), las células HeLa, las células de riñón de un hámster recién nacido (BHK), las células de riñón de mono (COS), las células de carcinoma hepatocelular humano (como Hep G2) y varias otras líneas de células. En determinadas realizaciones, las líneas de células se pueden seleccionar determinando qué líneas de células presentan niveles elevados de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a OPGL constitutivas.

De acuerdo con determinadas realizaciones, los anticuerpos del invento son útiles para detectar OPGL en muestras biológicas. En determinadas realizaciones, esto permite la identificación de células o tejidos que producen la proteína. En determinadas realizaciones, los anticuerpos que se unen a OPGL y bloquean la interacción con otros compuestos de unión pueden tener un uso terapéutico en la modulación de la diferenciación de osteoclastos y la reabsorción ósea. En determinadas realizaciones, los anticuerpos del OPGL pueden bloquear la unión de OPGL a ODAR, lo que puede resultar en un bloqueo de la cascada de transducción de la señal y la pérdida de activación de la transcripción mediada por NF- κ B. Los ensayos para medir la activación de la transcripción mediada por NF- κ B, utilizando, por ejemplo, un ensayo con un reportero de luciferasa, son conocidos por los especialistas cualificados.

Se revelan procedimientos de tratamiento de un trastorno óseo que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo del OPGL. Se revelan procedimientos de tratamiento de un trastorno óseo que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo del OPGL y otro agente terapéutico. En algunos de estos procedimientos, el agente terapéutico adicional se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. En determinados procedimientos, el trastorno óseo es un trastorno caracterizado por una pérdida ósea neta, incluyendo, a título meramente enunciativo, la osteopenia y la osteólisis. En determinados procedimientos, el tratamiento con un anticuerpo del OPGL se utiliza para contener el ritmo de reabsorción ósea. Por lo tanto, en determinados procedimientos, el tratamiento se puede utilizar para reducir el ritmo de reabsorción ósea cuando el ritmo de reabsorción esté por encima de lo normal, o para reducir la reabsorción ósea por debajo de los niveles normales, al objeto de compensar unos niveles de formación ósea por debajo de los normales. En determinados procedimientos, se puede testar la unión de los anticuerpos al OPGL en ausencia o presencia de OPGL y se puede examinar su capacidad para inhibir la osteoclastogénesis mediada por OPGL y/o la reabsorción ósea.

Las condiciones que se pueden tratar de acuerdo con determinados aspectos de la divulgación incluyen, a título meramente enunciativo, las siguientes:

osteoporosis, incluyendo, a título meramente enunciativo, osteoporosis primaria, osteoporosis endocrina (incluyendo, a título meramente enunciativo, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing y acromegalia), formas hereditarias y congénitas de osteoporosis (incluyendo, a título meramente enunciativo, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes, síndrome de Riley-Day), y osteoporosis debido a una inmovilización de las extremidades. Enfermedad de Paget (osteítis deformante) en adultos y jóvenes; Osteomielitis, una lesión infecciosa en los huesos, que provoca la pérdida ósea; Hipercalcemia, incluyendo, a título meramente enunciativo, hipercalcemia resultante de tumores sólidos (incluyendo, a título meramente enunciativo, mama, pulmón y riñón) y enfermedades malignas hematológicas (incluyendo, a título meramente enunciativo, mieloma múltiple, linfoma o leucemia), hipercalcemia idiopática e hipercalcemia asociada con el hipertiroidismo y los trastornos de la función renal; Osteopenia, incluyendo, a título meramente enunciativo, osteopenia tras una intervención quirúrgica, osteopenia inducida por la administración de esferoides, osteopenia asociada con trastornos del intestino grueso y delegado, y osteopenia asociada con enfermedades renales y hepáticas crónicas; osteonecrosis, es decir, la muerte de células óseas, incluyendo, a título meramente enunciativo, osteonecrosis asociada con lesiones traumáticas, osteonecrosis asociada con la enfermedad de Gaucher, osteonecrosis asociada con la anemia falciforme, osteonecrosis asociada con lupus eritematoso sistémico, osteonecrosis asociada con artritis reumatoide, osteonecrosis asociada con enfermedad periodontal, osteonecrosis asociada con metástasis osteolítica y osteonecrosis asociada con otra enfermedad; y pérdida de cartílago y erosión de las articulaciones asociadas con la artritis reumatoide.

En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se puede utilizar de forma independiente o con al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de trastornos óseos. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se utiliza conjuntamente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico adicional. Entre los agentes terapéuticos ejemplares que se pueden administrar con un anticuerpo del OPGL se incluyen, a título meramente enunciativo, los factores morfogénicos del hueso designados BMP-1 a BMP-12; el factor de crecimiento de transformación beta (TGF- β) y miembros de la familia TGF-p; inhibidores de la interleucina-1 (1L-1), incluyendo, a título meramente enunciativo, iL-1ra y derivados de la misma y Kineret™ (anakinra), inhibidores de TNF α , incluyendo, a título meramente enunciativo, receptores de TNF α solubles, Enbrel™ (etanercept) contra anticuerpos TNF α , Remicade™ (infliximab) y anticuerpos D2E7; hormona paratiroidea y análogos de la misma; proteína relacionada con la hormona paratiroides y análogos de la misma; prostaglandinas de la serie E; bifosfonatos (como alendronato y otros); minerales importantes para los huesos, como flúor y calcio; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), incluyendo, a título meramente enunciativo, inhibidores de COX-2, como Celebrex (celecoxib) y Vioxx™ (rofecoxib), inmunosupresores, como metotrexato o leflunomida; inhibidores de la serin-proteasa, incluyendo, a título meramente enunciativo, un inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores (SIP1); inhibidores de 1L-6 (incluyendo, a título meramente enunciativo, anticuerpos de IL-6), inhibidores de IL-8 (incluyendo,

a título meramente enunciativo, anticuerpos de IL-8}; inhibidores de IL-18 (incluyendo, a título meramente enunciativo, la proteína de enlace de IL-18 y anticuerpos de IL-18); moduladores de la enzima de conversión de la interleucina-1 (ICE); factores de crecimiento fibroblástico FGF-1 a FGF-10 y moduladores del FGF; antagonistas del PAF; un factor de crecimiento queratinocítico (KGF), moléculas relacionadas con el KGF y moduladores del KGF; moduladores de la metaloproteínasa de matriz (MMP); moduladores de la sintasa del óxido nítrico (NOS), incluyendo, a título meramente enunciativo, moduladores de NOS inducible; moduladores del receptor de glucocorticoides, moduladores del receptor de glutamato, moduladores de los niveles de lipopolisacáridos (LPS), y noradrenalina y moduladores y miméticos de la misma.

En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se utilizará con determinados agentes terapéuticos para tratar diversas enfermedades inflamatorias, autoinmunes u otras enfermedades que impliquen la pérdida de hueso. En determinados aspectos de la divulgación, en vista de la enfermedad y del nivel deseado de tratamiento, se podrán administrar dos, tres o más agentes. En determinados aspectos de la divulgación, estos agentes se podrán suministrar conjuntamente, mediante su inclusión en la misma fórmula. En determinados aspectos de la divulgación, estos agentes y un anticuerpo del OPGL se podrán suministrar conjuntamente, mediante su inclusión en la misma fórmula. En determinados aspectos de la divulgación, estos agentes se podrán suministrar conjuntamente, mediante su inclusión en un kit de tratamiento. En determinados aspectos de la divulgación, estos agentes y un anticuerpo del OPGL se podrán suministrar conjuntamente, mediante su inclusión en un kit de tratamiento. En determinados aspectos de la divulgación, estos agentes se podrán suministrar por separado. En determinados aspectos de la divulgación, cuando se administren mediante una terapia genética, se podrán incluir en el mismo vector los agentes de los genes que codifican la proteína y/o un anticuerpo del OPGL. En determinados aspectos de la divulgación, los agentes de los genes que codifican la proteína y/o un anticuerpo del OPGL pueden estar bajo el control de la misma región promotora. En determinados aspectos de la divulgación, los agentes de los genes que codifican la proteína y/o un anticuerpo del OPGL pueden estar en vectores separados.

En determinados aspectos de la divulgación, el presente invento está dirigido a un anticuerpo del OPGL y al menos un inhibidor de la interleucina-1 (IL-1) para su utilización en terapias y procedimientos de tratamiento que empleen estas terapias. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL y un inhibidor de la IL-1 y al menos una molécula adicional se utilizarán en una terapia. En determinados aspectos de la divulgación, los inhibidores de IL-1 y/o inhibidores de TNF- α se utilizarán conjuntamente con un anticuerpo del OPGL en los procedimientos de tratamiento. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL en combinación con inhibidores de la IL-1 y/o inhibidores del TNF- α se utilizarán para el tratamiento de enfermedades como el asma, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple.

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina antiinflamatoria. En determinados casos, la IL-1 es un mediador en muchas enfermedades y condiciones médicas. En determinados casos, la IL-1 es producida por células del sistema macrófago/monocito. En determinados casos, la IL-1 se produce de dos formas: IL-1 α (IL-1 α) e IL-1 β .

Una enfermedad o condición médica se considera una «enfermedad mediada por la interleucina-1» si la condición médica o enfermedad espontánea o experimental está asociada con niveles elevados de IL-1 en los fluidos corporales o tejidos y/o si las células o tejidos tomados del cuerpo producen niveles elevados de IL-1 en el cultivo. En determinados aspectos de la divulgación, estas enfermedades mediadas por la interleucina-1 también son reconocidas por las dos condiciones adicionales siguientes: (1) los hallazgos patológicos asociados con la enfermedad o la condición médica se pueden imitar experimentalmente en animales mediante la administración de IL-1 o la regulación al alza de la expresión de il-1; y (2) una patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o condición médica se pueden abolir mediante el tratamiento con agentes que inhiben la acción de la IL-1. En determinados aspectos de la divulgación, una o más de las anteriores condiciones se cumplen en una enfermedad mediada por la IL-1. En determinados aspectos de la divulgación, las tres condiciones se cumplen en una enfermedad mediada por la IL-1.

Entre las enfermedades agudas y crónicas mediadas por la interleucina-1 (IL-1) se incluyen, a título meramente enunciativo, las siguientes: pancreatitis aguda; esclerosis lateral amiotrófica (ALS o enfermedad de Lou Gehrig); enfermedad de Alzheimer; cachexia/anorexia, incluyendo, a título meramente enunciativo, la cachexia inducida por el SIDA; asma y otras enfermedades pulmonares; aterosclerosis; vasculitis autoinmune; síndrome de fatiga crónica; enfermedades asociadas con Clostridium, incluyendo, a título meramente enunciativo, diarrea asociada con Clostridium; indicaciones y enfermedades coronarias, incluyendo, a título meramente enunciativo, fallo cardíaco congestivo, restenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (por ejemplo, relacionada con una sepsis), e injerto de un bypass en la arteria coronaria; cáncer, incluyendo, a título meramente enunciativo, leucemias, incluyendo, a título meramente enunciativo, mieloma múltiple y leucemia mielógena (como AML y CML), y metástasis tumorales; diabetes (incluyendo, a título meramente enunciativo, diabetes dependiente de insulina); endometriosis; fiebre, fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad injerto contra huésped y/o rechazo de trasplante; shock hemorrágico; hiperalgesia; enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedades inflamatorias de una articulación, incluyendo, a título meramente enunciativo, osteoartritis, artritis psoriásica y artritis reumatoide; enfermedad ocular inflamatoria, incluyendo, a título meramente enunciativo, aquéllas asociadas, por ejemplo, con el trasplante de córnea; isquemia, incluyendo, a título meramente enunciativo, isquemia cerebral (incluyendo, a título meramente enunciativo, lesiones cerebrales como resultado, por ejemplo, de un traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebral, cada uno de los cuales puede desembocar en una neurodegeneración); enfermedad de Kawasaki; problemas de

aprendizaje; enfermedades pulmonares (incluyendo, a título meramente enunciativo, síndrome de distrés respiratorio agudo o ARDS); esclerosis múltiple; miopatías (como metabolismo de la proteína muscular, incluyendo, a título meramente enunciativo, metabolismo de la proteína muscular en la sepsis); neurotoxicidad (incluyendo, a título meramente enunciativo, la enfermedad inducida por el VIH); osteoporosis; dolor, incluyendo, a título meramente enunciativo, el dolor asociado con el cáncer; la enfermedad de Parkinson; enfermedad periodontal; parto pretérmino; psoriasis; daño por reperfusión; shock séptico; efectos colaterales de la terapia con radiación; enfermedad de la articulación mandibular temporal; trastornos del sueño; uveítis; y una enfermedad inflamatoria resultante, por ejemplo, de una distensión, un esguince, daños en los cartílagos, traumatismos, cirugía ortopédica, infección u otros procesos patológicos.

En determinados aspectos de la divulgación, un inhibidor de la IL-1 puede ser cualquier proteína o molécula capaz de prevenir específicamente la activación de receptores celulares de (L-1, que puede resultar de cualquier número de mecanismos. Entre los mecanismos ejemplares se incluyen, a título meramente enunciativo, la regulación a la baja de la producción de IL-1, la IL-1 sin uniones, la interferencia en la unión de IL-1 con su receptor, la interferencia en la formación del complejo del receptor de IL-1 (es decir, la asociación del receptor de IL-1 con una proteína accesoria del receptor de IL-1) y la interferencia con la modulación de la señalización de IL-1 tras la unión a su receptor.

Ciertos inhibidores de interleucina-1 incluyen, a título meramente enunciativo, antagonistas del receptor de IL-1, incluyendo, a título meramente enunciativo, Kineret™ (anakinra), variantes de IL-1ra_i, IL-1ra y derivados de IL-1ra, colectivamente denominadas «proteínas IL-1ra»; anticuerpos monoclonales del receptor de IL-1 (véase, por ejemplo, EP 623674), proteínas de unión a IL-1, incluyendo, a título meramente enunciativo, receptores de IL-1 soluble (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n° 5.492.888, la patente estadounidense n° 5.488.032, la patente estadounidense n° 5.464.937, la patente estadounidense n° 5.319.071 y la patente estadounidense n° 5.180.812 anticuerpos monoclonales de IL-1 (véase, por ejemplo, WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, patente estadounidense n° 4.935.343, EP 364778, EP 26761-1 y EP 220063 IL-1 proteínas accesorias del receptor» y anticuerpos de las mismas (véase, por ejemplo, WO 98/23067 y WO 99/37773 inhibidores de la enzima que convierte la interleucina-1 beta (ICE) o caspasa I (véase, por ejemplo, WO 99/46248, WO 99/47545 y WO 99/47154 que se pueden utilizar para inhibir la producción y secreción de IL-1 beta; inhibidores de la proteasa de interleucina-1 beta; y otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular de IL-1.

Los inhibidores de IL-1 ejemplares se revelan, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n° 5.747.444; 5.359.032; 5.608.035; 5.843.905; 5.359.032; 5.866.576; 5.869.660; 5.869.315; 5.872.095; 5.955.480; 5.965.564; solicitudes de patentes internacionales (WO) 98/21957, 96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 33/17661, 97/08174, 95/34326, 99/38426, 99/36415; solicitudes de patentes europeas (EP) 534978 y 894795; y solicitud de patente francesa FR 2762514.

El antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como inhibidor natural de la interleucina-1 y es miembro de la familia de la IL-1, que incluye IL-1a e IL-1 p. Determinados antagonistas del receptor, incluyendo la IL-1ra y sus variantes y derivados, así como los procedimientos para generarlos y utilizarlos, se describen en la patente estadounidense n° 5.075.222; WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828 y WO 99/36541. En determinados aspectos de la divulgación, un antagonista del receptor de IL-1 puede ser glicosilado. En determinados aspectos de la divulgación, un antagonista del receptor de IL-1 puede ser no glicosilado.

Tres formas de IL-1ra y variantes de la misma se describen en la patente estadounidense n° 5.075.222 (la patente '222). La primera forma, denominada «IL-1 Hn» en la patente (222). La primera forma, denominada «IL-1» en la patente '222, está caracterizada como una molécula 22-23 kD en SDS-PAGE con un punto isoeléctrico aproximado de 4,8, que eluye de una columna de FPLC Mono Q a unos 52 mM NaCl en tampón Tris, pH 7,6. La segunda forma, IL 1 raB, está caracterizada como una proteína 22-23 kD, que eluye de una columna Mono Q a 48 mM NaCl. Tanto IL-1raa como IL-1raâ son glicosiladas. La tercera forma, IL-1 rax, está caracterizada como una proteína 20 kD, que eluye de una columna Mono Q a 48 mM NaCl y es no glicosilada. La patente '222 también describe determinados procedimientos para aislar los genes que codifican los inhibidores, clonar esos genes en vectores apropiados, transformar y transfectar esos genes a determinados tipos de células, y para expresar esos genes para producir los inhibidores.

En determinados aspectos de la divulgación, las eliminaciones, inserciones y/o sustituciones (individual o colectivamente denominadas «variante(s)» se realizan en las secuencias de aminoácidos de la IL-1ra. En determinados aspectos de la divulgación, una variante de IL-1ra es biológicamente activa (por ejemplo, posee la capacidad de inhibir la IL-1).

En determinadas realizaciones, el presente invento está dirigido a un anticuerpo del OPGL y al menos un inhibidor de TNF α para su utilización en terapias y procedimientos de tratamiento que empleen estas terapias. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL y un inhibidor de TNF α y al menos una molécula adicional descrita en el presente se utilizarán en una terapia.

Determinadas enfermedades y condiciones médicas están mediadas por el TNF y se pueden considerar enfermedades

inflamatorias. El término «enfermedad mediada por el TNF» utilizado en el presente incluye, a título meramente enunciativo, una enfermedad o condición médica que está asociada con niveles elevados de TNF en los tejidos o fluidos corporales y/o en la que las células o tejidos tomados del cuerpo producen niveles elevados de TNF en cultivo. En determinados aspectos de la divulgación, una enfermedad es una enfermedad mediada por el TNF si (a) los hallazgos patológicos asociados con la enfermedad o condición médica se pueden imitar experimentalmente en animales mediante la administración o regulación al alza de la expresión de TNF y/o (2) una patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o condición médica se pueden inhibir o abolir mediante el tratamiento con agentes que inhiben la acción del TNF.

Determinadas enfermedades crónicas y agudas mediadas por el TNF incluyen, a título meramente enunciativo: cachexia y anorexia; cáncer, incluyendo, a título meramente enunciativo, leucemia; síndrome de fatiga crónica; indicaciones y/o enfermedades coronarias, incluyendo, a título meramente enunciativo, fallo cardíaco congestivo, restenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (incluyendo, a título meramente enunciativo, esta enfermedad relacionada con la sepsis), e injerto de un bypass en la arteria coronaria; depresión; diabetes, incluyendo, a título meramente enunciativo, la diabetes Juvenil tipo 1, diabetes mellitus y resistencia a la insulina (incluyendo, a título meramente enunciativo, la resistencia a la insulina asociada con la obesidad); endometriosis, endometritis y enfermedades relacionadas; fibromialgia y analgesia; enfermedad injerto contra huésped; hiperalgesia; enfermedades inflamatorias intestinales, incluyendo, a título meramente enunciativo, la enfermedad de Crohn y diarrea asociada con Clostridium difficile; isquemia, incluyendo, a título meramente enunciativo, isquemia cerebral, que incluye, a título meramente enunciativo, lesiones cerebrales como resultado de un traumatismo, epilepsia, hemorragia y/o accidente cerebral; enfermedad pulmonar, incluyendo, a título meramente enunciativo, síndrome de distrés respiratorio agudo, asma y fibrosis pulmonar; esclerosis múltiple; enfermedades neuroinflamatorias; enfermedades y trastornos oculares, incluyendo, a título meramente enunciativo, trasplante de córnea, degeneración ocular y uveítis; dolor, incluyendo, a título meramente enunciativo, dolor relacionado con el cáncer; pancreatitis; enfermedades periodontales; pityriasis rubra pilaris (PRP); prostatitis, incluyendo prostatitis bacteriana y no bacteriana, y enfermedades relacionadas; psoriasis y enfermedades relacionadas; fibrosis pulmonar; lesiones por reperfusión; enfermedades reumáticas, incluyendo, a título meramente enunciativo, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil (incluyendo, a título meramente enunciativo, artritis reumatoide juvenil), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, enfermedad de Still, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, escleroderma, esclerosis sistémica, vasculitis (por ejemplo, enfermedad de Kawasaki), vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos («séptica»), síndrome de Sjögren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de células gigantes); shock séptico; efectos colaterales de la terapia de radiación; lupus eritematoso sistémico (SLE); enfermedad de la articulación mandibular temporal; tiroiditis; y trasplante de tejido y/o enfermedad inflamatoria, por ejemplo, resultante de una distensión, un esguince, daños en los cartílagos, traumatismos, cirugía ortopédica, infección (por ejemplo, VIH, Clostridium difficile y especies relacionadas) u otros procesos patológicos.

En determinadas realizaciones, los inhibidores del TNF pueden actuar al menos regulando a la baja o inhibiendo la producción de TNF, uniéndose al TNF libre, interfiriendo en la unión de TNF a su receptor e interfiriendo en la modulación de la señalización del TNF tras la unión a su receptor. El término «inhibidor del TNF» incluye, a título meramente enunciativo, los receptores de TNF solubilizados, incluyendo, a título meramente enunciativo, el receptor del factor de necrosis tumoral soluble tipo I (sTNF-RI; también denominado el receptor p55), el receptor del factor de necrosis tumoral soluble tipo II (también denominado p75), y Enbrel™ (etanercept), anticuerpos del TNF, incluyendo, a título meramente enunciativo, Remicade™ (infliximab) y D2E7 (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n° 6.090.382 y 6.258.562); anticuerpos del receptor de TNF; sTNF-RI (véase, por ejemplo, WO 98/24463), etanercept (Enbrel™), Avakine™; inhibidores de la enzima de conversión de TNF-α (TACE); y otras moléculas que afectan a la actividad del TNF.

Los inhibidores del TNF-α ejemplares se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patentes europeas EP 308 378; EP 422 339; EP 393 438; EP 398 327; EP 412 486; EP 418 014, EP4 1 7 563, EP433 900; EP 464 533; EP512 528; EP 526 905; EP 568 928; EP 607 776, que describe el uso de leflunomida para la inhibición de TNF-α; EP 663 210; EP 542 795; EP 818 439; EP 664 128; EP 542 795; EP 741 707; EP 874 819 ; EP 882 714; EP 880 970; EP 648 783; EP 731 791; EP 895 988; EP 550 376; EP 882 714; EP 853 083; EP 550 376; EP 943 616; EP 939 121; EP 614 984 ; EP 853 083; las patentes estadounidenses n° 5.136.021; 5.929.117; 5.948.638; 5.807.862; 5.695.953; 5.834.435; 5.817.822; 5.830.742; 5.834.435; 5.851.556; 5.853.977; 5.359.037; 5.512.544; 5.695.953; 5.811.261; 5.633.145; 5.863.926; 5.866.616; 5.641.673; 5.869.677; 5.869.511; 5.872.146; 5.854.003; 5.856.161; 5.877.222; 5.877.200; 5.877.151; 5.886.010; 5.869.660; 5.859.207; 5.891.883; 5.877.180; 5.955.480; 5.955.476; 5.955.435; 5.994.351; 5.990.119; 5.952.320; 5.962.481; solicitudes de patentes internacionales WO 90/13575, WO 91/03553, WO 92/01002, WO 92/13095, WO 92/15221, WO 93/07863, WO 93/21946, WO 93/19777, WO 95/34326, WO 96/28546, WO 98/27298, WO 98/30541, WO 96/38150, WO 96/38150, WO 97/18207, WO 97/15561, WO 97/12902, WO 96/25861, WO 96/12735, WO 96/11209, WO 98/39326, WO 98/39316, WO 98/38859, WO 98/39315, WO 98/42659, WO 98/39329, WO 98/43959, WO 98/45268, WO 98/47863, WO 96/33172, WO 96/20926, WO 97/37974, WO 97/37973, WO 97/47599, WO 96/35711, WO 98/51665, WO 98/43946, WO 95/04045, WO 98/56377, WO 97/12244, WO 99/00364, WO 99/00363, WO 98/57936, WO 99/01449, WO 99/01139, WO 98/56788, WO 98/56756, WO 98/53842, WO 98/52948, WO 98/52937, WO 99/02510, WO 97/43250, WO 99/06410, WO 99/06042, WO 99/09022, WO 99/08683, WO 99/07679, WO 99/09965, WO 99/07704, WO 99/06041, WO 99/37818, WO 99/37625, WO 97/11668,

WO 99/50238, WO 99/47672, WO 99/48491; solicitudes de patentes japonesas 10147531, 10231285, 10259140, y 10130149, 10316570, 11001481, y 127,800/1991; solicitud de patente alemana n° 19731521; y solicitudes de patentes británicas n° 2 218 101, 2 326 881, 2 246 569.

5 EP 393 438 y EP 422 339 describen las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de un receptor de TNF soluble de tipo I (también conocido como el inhibidor de TNF 30kDa o sTNFR-I) y un receptor de TNF soluble de tipo II (también conocido como inhibidor de TNF 40kDa o sTNFR-II), denominados colectivamente «sTNFRs». EP 393 438 y EP 422 339 también describen formas modificadas de sTNFR-I y sTNFR-II, incluyendo, a título meramente enunciativo, fragmentos, derivados funcionales y variantes. Por otra parte, EP 393 438 y EP 422 339 describen determinados procedimientos para aislar los genes que codifican los inhibidores, clonar esos genes en vectores apropiados, 10 transformar o transfectar esos genes a determinados tipos de células, y expresar esos genes para producir los inhibidores.

sTNFR-I y sTNFR-II son miembros de la superfamilia de receptores del factor de crecimiento nervioso/receptor de TNF, que incluye el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF), el antígeno de células B CD40, 4-1BB, el antígeno de células T de rata MRC OX40, el antígeno Fas y los antígenos CD27 y CD30 (Smith y col. (1990) *Science*, 248:1019-1023). Una característica conservada de ese grupo de receptores de la superficie celular es un dominio de unión del ligando extracelular rico en cisteína, que se puede dividir en cuatro temas repetidos de unos 40 aminoácidos que contienen 4-6 residuos en posiciones que están bien conservadas (Smith y col. (1990), *supra*).

EP 393 438 muestra un inhibidor del TNF 40kDa $\Delta 51$ y un inhibidor del TNF 40kDa TNF $\Delta 53$, que son versiones truncadas de la proteína del inhibidor TNF 40kDa recombinante en toda su longitud. $\Delta 51$ y $\Delta 53$ tienen 51 o 53 20 aminoácidos, respectivamente, eliminados del carboxi-terminal de la proteína madura.

La solicitud PCT publicada n° WO 98/01555 describe formas truncadas de sTNFR-I y sTNFR-II que no contienen el cuarto dominio (residuos de aminoácidos Thr¹²⁷-Asn¹⁶¹ de sTNFR-I y residuos de aminoácidos Pro¹⁴¹-Thr¹⁷⁹ de sTNFR-III); una porción del tercer dominio (residuos de aminoácidos Asn¹¹¹-Cys¹²⁶ de sTNFR-I y residuos de aminoácidos Pro¹²³-Lys¹⁴⁰ de sTNFR-II); y, opcionalmente, no contienen una porción del primer dominio (residuos de aminoácidos Asp¹-Cys¹⁹ de sTNFR-I y residuos de aminoácidos Leu¹-Cys³² de sTNFR-II). En determinados aspectos de la divulgación, los sTNFRs truncados incluyen las proteínas representadas por la fórmula R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂ y R₄-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R_s. Estas proteínas son formas truncadas de sTNFR-I y sTNFR-II, respectivamente.

«R₁-[Cys¹⁹-Cys¹⁰³]-R₂» representa en el presente una o más de las proteínas en las que [Cys¹⁹-Cys¹⁰³] son los 30 residuos 19 a 103 de sTNFR-I, cuya secuencia se recoge en la Figura 1 de WO 98/01555; donde R₁ representa un grupo de aminas metioniladas y no metioniladas de Cys¹⁹ o uno o más residuos de aminoácidos amino-terminales seleccionados de Cys¹⁸ a Asp¹; y donde R₂ representa un grupo carboxi de Cys¹⁰³ o uno o más residuos de aminoácidos carboxi-terminales seleccionados de Phe^{1w} a Leu¹¹⁰.

Los sTNFR I truncados ejemplares que se utilizarán en El presente invento incluyen, a título meramente enunciativo, sTNFR-I 2.6D/C105, sTNFR-I 2.6D/C106, sTNFR-I 26D/N105, sTNFR-I 23D/d8, sTNFR-I 2.3D/d18, sTNFR-I 2.3D/d15, 35 metionilados o no metionilados, y variantes y derivados de los mismos. Ciertos sTNFR-1 truncados ejemplares se describen, por ejemplo, en la solicitud PCT publicada n°WO 98/01555.

«R₃-[Cys³²-Cys¹¹⁵]-R₄» representa en el presente una o más proteínas donde [Cys³²-Cys¹¹⁵] son los residuos Cys³² a Cys¹¹⁵ de sTNFR-II, cuya secuencia se recoge en la Figura 8 de WO 98/01555; donde R₃ representa un grupo de aminas metioniladas o no metioniladas de Cys³² o uno o más residuos de aminoácidos amino-terminales seleccionados de Cys³¹ a Leu¹; y donde R₄ representa un grupo carboxi de Cys¹¹⁵ o uno o más residuos de aminoácidos carboxi-terminales seleccionados de Ala¹¹⁶ a Arg¹²².

En determinados aspectos de la divulgación, el presente invento está dirigido a un anticuerpo del OPGL y al menos un inhibidor de la serin-proteasa para utilizarlo en una terapia y procedimientos de tratamiento que utilicen tales 45 terapias. En determinadas realizaciones, un anticuerpo del OPGL, un inhibidor de la serin-proteasa y al menos una molécula adicional descrita en el presente se utilizarán en una terapia.

Las enzimas proteolíticas endógenas pueden degradar los organismos invasores, complejos antígeno-anticuerpo y ciertas proteínas de los tejidos que ya no son necesarias o útiles. Los agentes infecciosos pueden introducir enzimas proteolíticas adicionales en el organismo. Los inhibidores de la proteasa pueden regular las enzimas proteolíticas endógenas e invasoras.

50 En determinados aspectos de la divulgación, los inhibidores de la proteasa naturalmente presentes sirven para controlar las proteasas endógenas limitando sus reacciones local y temporalmente. En determinados aspectos de la divulgación, los inhibidores de proteasa pueden inhibir las proteasas introducidas en el organismo por agentes infecciosos. En ciertos casos, los tejidos que son particularmente propensos a las infecciones y ataques proteolíticos, incluyendo, a título meramente enunciativo, los del tracto respiratorio, son ricos en inhibidores de proteasa.

55 Los inhibidores de proteasa comprenden aproximadamente el 10% de las proteínas plasmáticas humanas. Al menos ocho inhibidores han sido aislados en esta fuente y descritos en la bibliografía. Éstos incluyen, a título meramente enunciativo, alfa 2-macroglobulina (alfa 2M), inhibidor de proteasa alfa 1 (alfa 1P1), alfa 1-anéiquimoiripsina (alfa

1Achy), alfa 1-anticolagenasa (alfa 1AC) e inhibidor de inter-alfa-tripsina (I-alfa-I).

En ciertos casos, una alteración del equilibrio del inhibidor de proteasa/proteasa puede provocar una destrucción de tejido mediada por la proteasa, incluyen, a título meramente enunciativo, enfisema, artritis, glomerulonefritis, periodontitis, distrofia muscular, invasión tumoral y algunas otras condiciones patológicas. En ciertas situaciones, como

Por otra parte, en ciertos casos, una capacidad reducida del inhibidor de regulación del organismo también puede causar alteraciones en el equilibrio inhibidor de proteasa/proteasa. Un ejemplo de esta capacidad reducida del inhibidor de regulación es una deficiencia del inhibidor de proteasa alfa 1, que está asociado con el desarrollo de un enfisema pulmonar.

En determinados casos, se pueden producir graves daños en el organismo cuando se dan estas condiciones anómalas, a menos que se puedan tomar medidas para controlar las enzimas proteolíticas. Por lo tanto, se han buscado inhibidores de proteasa que se puedan administrar a un organismo para controlar las enzimas proteolíticas.

La elastasa leucocitaria, tripsina, catepsina G y elastasa pancreática son algunos ejemplos de una clase de proteasas conocidas como serin-proteasas.

En ciertos casos, la elastasa leucocitaria, cuando se libera extracelularmente, degrada el tejido conectivo y otras proteínas valiosas. Mientras que un organismo que funciona con normalidad degrada una cierta cantidad de tejido conectivo y otras proteínas, la presencia de una cantidad excesiva de elastasa leucocitaria puede estar asociada con diversas condiciones patológicas, entre las que se incluyen, a título meramente enunciativo, el enfisema y la artritis reumatoide. En determinados aspectos de la divulgación, para contrarrestar los efectos de la elastasa leucocitaria cuando está presente en cantidades superiores a lo normal, se ha buscado un inhibidor de la proteasa que sea específico para la elastasa leucocitaria. Este inhibidor de la proteasa podría ser útil si se pudiese aislar o preparar en una forma purificada y en cantidades suficientes para que resultase útil desde el punto de vista farmacéutico.

Ciertos inhibidores de la elastasa se describen, por ejemplo, en Schiessler y col., *Acid-Stable Inhibitors of Granulocyte Neutral Proteases in Human Mucous Secretions: Biochemistry and Possible Biological Function*, en *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leucocytes*, Havemann y col. (eds), Urban and Schwarzenberg, Inc. (1978), y en Travis a Saivesen, *Ann. Rev. Biochem.* 52: 655-709 (1983).

En determinados casos, la tripsina inicia la degradación de ciertos tejidos blandos de los órganos, como el tejido pancreático, durante diversas condiciones agudas, incluyendo, a título meramente enunciativo, la pancreatitis. Un inhibidor de la tripsina podría ser útil si se pudiese aislar y preparar en una forma purificada y en cantidades suficientes para que resultase útil desde el punto de vista farmacéutico.

La catepsina G es otra proteasa presente en los leucocitos. La catepsina G es capaz de degradar diversas proteínas *in vitro*, incluyendo las de las vías de complemento. La elastasa pancreática es otra proteasa que puede influir en la pancreatitis. Así, los inhibidores de estas proteasas también pueden tener valor farmacéutico.

En determinados aspectos de la divulgación, se cree que la especificidad del sustrato y la sensibilidad a diferentes inhibidores de serin-proteasas son el resultado de los cambios solamente en algunos residuos de aminoácidos. Por analogía, puede ser posible concebir una clase de inhibidores de serin-proteasa en la que los cambios en una cantidad de aminoácidos relativamente escasa permitirán la inhibición de diferentes proteasas. En determinados aspectos de la divulgación, un miembro de esta clase inhibe todas las serina proteasas.

Un inhibidor de la serin-proteasa ejemplar secreta el inhibidor de la proteasa leucocítica (SLPI) y fragmentos y análogos del mismo. Los inhibidores de la serin-proteasa ejemplares también incluyen, a título meramente enunciativo, antileucoproteasa (ALP), inhibidor de proteasa mucosa (MPI), inhibidor seminal humano I (HUSI-I), inhibidor de moco bronquial (BMÍ) e inhibidor de moco cervical (CUSÍ). En determinados aspectos de la divulgación, un inhibidor de la serin-proteasa también puede ser el modulador de LPS. Véase, por ejemplo, Jin y col. (1997), *Cell* 88(3): 417-26. En determinadas realizaciones, estas moléculas son apropiadas para su uso en condiciones que provocan pérdida de hueso, porque están preferentemente dirigidas al cartílago.

Los inhibidores de serin-proteasa ejemplares se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n° 4.760.130; 5.900.400; y 5.633.227. Las moléculas recogidas en las referencias mencionadas, así como cualquier variante o análogo de las mismas, se denominan colectivamente «inhibidores de la serin-proteasa».

IL-18 es una citocina proinflamatoria que se descubrió que induce interferón- γ y anteriormente se denominaba factor de inducción de interferón gamma (IGIF). En determinados casos, se ha demostrado que la IL-1 regula al alza la producción de IL-18, y que IL-18 induce la producción de una serie de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6 y MMP-1. Véase, por ejemplo, Dinarello y col. (1998), *J. Leukocyte Biol.* 63: 655-64. En determinados casos, la caspasa 1 también es importante para la producción de IL-18. Los experimentos también sugieren que el TNF- α regula la producción de IL-18, h que la inhibición simultánea de TNF- α e IL-18 protege contra la toxicidad hepática. Véase, por ejemplo, Faggioni y col, (2000), *PNAS* 97: 2367-72.

IL-18 actúa *in vivo* a través de un sistema receptor reminiscente del sistema IL-1. IL-18 interactúa con un receptor de la superficie celular (IL-18R), que interactúa con una proteína accesoria (IL-18RAcP). La señalización mediada por IL-18 se produce tras la formación del complejo de IL-18, IL-18Re IL-18RAcP. Un inhibidor natural para IL-18 es IL-18bp. En determinadas realizaciones, IL-18bp actúa como un «receptor señuelo» uniéndose a las moléculas de IL-18 e impidiendo la interacción con IL-18R.

En determinados aspectos de la divulgación, el presente invento está dirigido a un anticuerpo del OPGL y al menos un inhibidor de IL-18 para su utilización en terapias y procedimientos de tratamiento que empleen estas terapias. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL y un inhibidor de IL-18 y al menos una molécula adicional descrita en el presente se utilizarán en una terapia. Entre las condiciones ejemplares que se pueden tratar de acuerdo con determinados aspectos de la divulgación incluyen, a título meramente enunciativo, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades mediadas por IL-1 y las enfermedades mediadas por TNF. Entre las condiciones ejemplares que se pueden tratar con un anticuerpo del OPGL y al menos un inhibidor de IL-18 de acuerdo con determinados aspectos de la divulgación se incluyen, a título meramente enunciativo, la artritis, incluyendo, a título meramente enunciativo, la artritis reumatoide; el lupus eritematoso sistémico (SLE); la enfermedad injerto contra huésped (GvHD); la hepatitis; sepsis; y la pérdida de hueso y cartílago que acompañan a estas enfermedades.

Entre los inhibidores de IL-18 se incluyen, a título meramente enunciativo, los anticuerpos que se unen a IL-18; anticuerpos que se unen a IL-18R; anticuerpos que se unen a IL-18RAcP; IL-18bp; fragmentos de IL-18R (por ejemplo, un dominio extracelular solubilizado del receptor de IL-18); péptidos que se unen a IL-18 y reducen o impiden su interacción con IL-18R; péptidos que se unen a IL-18R y reducen o impiden su interacción con IL-18 o con IL-18RAcP; péptidos que se unen a IL-18RAcP y reducen o impiden su interacción con IL-18R; y moléculas pequeñas que reducen o impiden la producción de IL-18 o la interacción entre cualquiera de las IL-18, IL-18R e IL-18RAcP.

Ciertos inhibidores de IL-18 se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 5.912.324, publicada el 14 de julio de 1994; EP 0 962 531, publicada el 8 de diciembre de 1999; EP 712 931, publicada el 15 de noviembre de 1994; la patente estadounidense n° 5.914.253, publicada el 14 de julio de 1994; WO 97/24441, publicada el 10 de julio de 1997; la patente estadounidense n° 6.060.283, publicada el 9 de mayo de 2000; EP 850 952, publicada el 26 de diciembre de 1996; EP 864 585, publicada el 16 de septiembre de 1998; WO 98/41232, publicada el 24 de septiembre de 1998; la patente estadounidense n° 6.054.487, publicada el 25 de abril de 2000; WO 99/09063, publicada el 14 de agosto de 1997; WO 99/22760, publicada el 3 de noviembre de 1997; WO 99/37772, publicada el 23 de enero de 1998; WO 99/37773, publicada el 20 de marzo de 1998; EP 0 974 600, publicada el 26 de enero de 2000; WO 00/12555, publicada el 9 de marzo de 2000; la solicitud de patente japonesa JP 111,399/94, publicada el 31 de octubre de 1997; la solicitud de patente israelí IL 121554 AO, publicada el 8 de febrero de 1998).

En determinados aspectos de la divulgación, se puede utilizar un anticuerpo del OPGL con al menos un agente terapéutico para la inflamación. En determinados aspectos de la divulgación, se puede utilizar un anticuerpo del OPGL con al menos un agente terapéutico para un trastorno inmunológico. Entre los agentes terapéuticos ejemplares para la inflamación y los trastornos inmunológicos se incluyen, a título meramente enunciativo, los corticosteroides, incluyendo, a título meramente enunciativo, la prednisolona; los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), incluyendo, a título meramente enunciativo, los inhibidores de la ciclooxigenasa de tipo 1 (COX-1) y la ciclooxigenasa de tipo 2 (COX-2); fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), incluyendo, a título meramente enunciativo, el metotrexato, la hidroxiclороquina, cloroquina, ciclosporina, compuestos áuricos (como auranofina, aurotiomalato y aurotioglucosa), y leflunomida; inhibidores de la fosfodiesterasa, incluyendo, a título meramente enunciativo, rolipram y pentoxifilina; tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamycin); ácido micofenólico; inhibidores de 5-lipoxigenasa, incluyendo, a título meramente enunciativo, zileuton; moduladores de la interleucina-6 (IL-6); moduladores de moléculas pequeñas de proteína quinasa mitógeno activada 38 kDa (p38-MAPK); moduladores de moléculas pequeñas de moléculas intracelulares implicadas en las vías de inflamación, donde estas moléculas intracelulares incluyen, a título meramente enunciativo, jnk, IKK, NF-κB, ZAP70 e Ick. Ciertos agentes terapéuticos para la inflamación ejemplares se describen, por ejemplo, en C.A. Dinarello y L.L. Moldawer, *Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians*, tercera edición (2001). Amgen Inc. Thousand Oaks, OA. Ciertos agentes terapéuticos para enfermedades inflamatorias y autoinmunes ejemplares incluyen, a título meramente enunciativo, los moduladores de interferón gamma (IFN-γ); moduladores de OX40/OX40L (incluyendo las formas solubles de OX40); moduladores del ligando 4-1BB/4-1BB (incluyendo formas solubles de 4-1BB); y moduladores de las vías coestimuladoras de células B y células T, incluyendo, a título meramente enunciativo, los moduladores de las parejas de ligandos del receptor CD28/B7, CD40/CD40L, ICOS/B7RP1 y AGP-3/TACI/BAFFR (AGP-3 se une tanto a los receptores de TACI como de BAFFR). Ciertos moduladores ejemplares de las vías coestimuladoras de células B y células T incluyen, a título meramente enunciativo, inhibidores de CD28, B7.1 y B7.2 (incluyendo formas solubles de B7.1 o B7.2 y formas solubles de CTLA4, pudiéndose fusionar ambas con una proteína o un péptido heterólogo que reduce o impide la degradación y/o incrementa la vida media, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad o incrementa la actividad biológica de una proteína terapéutica al incrementar la solubilidad o la vida media en circulación); inhibidores de CD40 y CD40L (incluyendo formas solubles de CD40 que se pueden fusionar con una proteína o péptido heterólogo); inhibidores de ICOS y B7RP1 (incluyendo formas solubles de ICOS que se pueden fusionar con una proteína o péptido heterólogo) e inhibidores de AGP-3, TACI y BAFFR (incluyendo formas solubles de TACI y BAFFR). ICOS, B7RP1 y sus inhibidores se describen, por ejemplo, en W000/46240. AGP-3, TACI y BAFFR y sus inhibidores se describen, por ejemplo, en W000/47740, WO01/85872, WO02/15273, W098/39361, y von Bulow y Bram (1997) *Science* 278:138-140.

- 5 En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se utilizará para tratar la pérdida de hueso, incluyendo, a título meramente enunciativo, la pérdida de hueso resultante de la destrucción osteolítica del hueso causada por tumores malignos o metastásicos. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se puede utilizar para tratar la pérdida de hueso asociada con el cáncer. Entre los cánceres ejemplares se incluyen, a título meramente enunciativo, los de mama, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, recto, vejiga, cervical, de ovarios e hígado, así como el cáncer del tracto gastrointestinal. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se utilizará para tratar la pérdida de hueso asociada, por ejemplo, con ciertas enfermedades malignas hematológicas, incluyendo, a título meramente enunciativo, el mieloma múltiple y el linfoma, incluyendo la enfermedad de Hodgkin.
- 10 En determinados aspectos de la divulgación, solamente se administra un anticuerpo del OPGL. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se administrará al menos con otro agente terapéutico, incluyendo, a título meramente enunciativo, al menos otro agente para el tratamiento del cáncer. Entre los agentes para el tratamiento del cáncer ejemplares se incluyen, a título meramente enunciativo, la radioterapia y la quimioterapia. En determinados aspectos de la divulgación, la quimioterapia puede implicar el tratamiento con uno o más de los siguientes: antracidas, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo y otros fármacos conocidos en el campo. En determinadas realizaciones, un agente para el tratamiento del cáncer es un antagonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). En determinadas realizaciones, un antagonista de la LHRH es un antagonista de un péptido.
- 15 En determinados aspectos de la divulgación, un antagonista de una LHRH comprende el péptido: Ac-D-Nal-4-CI-Phe-D-Phe-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-lys (iPr)-Pro-D-Ala NH₂ (SEQ ID NO: 20), donde Nal es 3-(2-naftil) afaninil; 4-CI-Phe es (4'-clorofenil) alaninil; Pal es 3-(3'-piridil) alaninil; y Lys(iPr) es N-épsilon-2-propil-lisinil.
- 20 En determinados aspectos de la divulgación, un antagonista de la LHRH es un decapeptido antagonista de LHRH. Determinados decapeptidos ejemplares se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 5.843.901.
- 25 De acuerdo con determinadas realizaciones, los anticuerpos terapéuticos ejemplares incluyen, a título meramente enunciativo, anticuerpos de ratón, quiméricos ratón-humano, de injerto de CDR y totalmente humanos, y anticuerpos sintéticos, entre los que se incluyen, a título meramente enunciativo, los seleccionados revisando las bibliografías de anticuerpos. Entre los anticuerpos ejemplares se incluyen, a título meramente enunciativo, los que se unen a las proteínas de la superficie de las células Her2, CDC20, CDC33, glicoproteína tipo mucina y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presente en las células tumorales y que opcionalmente provoca un efecto citostático y/o citotóxico sobre las células tumorales que presentan estas proteínas. Entre los anticuerpos ejemplares también se incluyen HERCEPT1N™ (trastuzumab), que se puede utilizar para tratar el cáncer de mama y otras formas de cáncer, y RITUXAN™ (rituximab), ZEVALIN™ (ibritumomab tiuxetan), y LYMPHOCIDE™ (epratuzumab), que se puede utilizar para tratar el linfoma no Hodgkin y otras formas de cáncer. Ciertos anticuerpos ejemplares también incluyen ERBITUX™ (IMC-C225), BEXXAR™ (iodina 131 tositumomab) y Campath.
- 30 En determinados aspectos de la divulgación, los agentes para el tratamiento del cáncer son polipéptidos que provocan selectivamente apoptosis en las células tumorales, incluyendo, a título meramente enunciativo, el polipéptido relacionado con el TNF, TRAIL. En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se puede administrar antes, de forma concurrente o con posterioridad a la terapia con un agente para tratar el cáncer. En determinados aspectos de la divulgación, se puede administrar un anticuerpo del OPGL profilácticamente para impedir o mitigar la aparición de la pérdida de hueso por cáncer metastásico. En determinados aspectos de la divulgación, se puede administrar un anticuerpo del OPGL para el tratamiento de una condición existente de pérdida de hueso provocada por la metástasis.
- 35 En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL se utilizará para prevenir y/o tratar la pérdida de hueso asociada con un mieloma múltiple y/o evitar y/o tratar la enfermedad en sí. El mieloma múltiple es un tumor derivado de las células B que puede provocar una morbilidad y/o mortalidad significativas. En determinados casos, una manifestación clínica de mieloma múltiple es la pérdida de hueso focal, que se puede deber a un incremento de la activación del osteoclasto en regiones localizadas. Muchos pacientes con mieloma presentan lesiones óseas visibles mediante análisis radiológico y sufren dolor esquelético. En determinados casos, los pacientes con mieloma son susceptibles a las fracturas patológicas del hueso afectado, que se pueden producir de forma espontánea o debido a una lesión. En determinados casos, las lesiones esqueléticas que ocurren durante un mieloma no solamente provocan fracturas de huesos, sino también deformidad y en ocasiones compresión nerviosa, particularmente en la columna vertebral. En algunos pacientes, se produce un incremento patológico del calcio sérico (hipercalcemia), que puede causar problemas graves durante el tratamiento de la enfermedad. En determinados aspectos de la divulgación, se puede administrar un anticuerpo del OPGL a los pacientes para reducir o bloquear la reabsorción ósea y liberar calcio, lo que puede reducir el riesgo de fracturas y de deformidad de la columna.
- 40 En determinados casos, las células del mieloma no participan directamente en la destrucción del hueso, sino que producen señales extracelulares que conducen a la diferenciación y activación del osteoclasto. En determinados casos, los osteoclastos producen niveles elevados de citocina IL-6, particularmente cuando son activados. IL-6 es un factor de crecimiento B-ce/J, y contribuye al crecimiento de las células del mieloma humano y murino *in vitro*. Las células del mieloma también pueden producir OPGL, directa o indirectamente, lo que puede provocar una lisis ósea
- 45
- 50
- 55
- 60

local alrededor de las células del mieloma incrustadas en los espacios de la médula ósea. En determinados casos, los osteoclastos normales adyacentes a las células del mieloma, a su vez, producen IL-6, lo que puede provocar la expansión local de las células tumorales. Las células del mieloma se expanden de forma clonal y pueden ocupar espacios del hueso que se crean mediante una reabsorción ósea inapropiada.

5 Se ha observado que la administración de OPG en roedores induce una muerte rápida de la población de osteoclastos (véase, por ejemplo, Lacey y col. (2000) *Am. J. Pathol.* 157:435-448). Una reducción del número de osteoclastos puede contrarrestar el efecto del incremento de la producción IL-6 de estas células y, por lo tanto, puede afectar al crecimiento y a la supervivencia de las células del mieloma dentro del hueso trabecular. Así, en determinados aspectos de la divulgación, la administración de un anticuerpo del OPGL a un paciente con mieloma no solamente puede
10 bloquear el exceso de reabsorción ósea, sino que también puede afectar a la expansión y a la supervivencia del propio tumor.

Las células B expresan el receptor de OPGL, ODAR. Las células del mieloma también expresan ODAR y, además, producen OPGL. En determinados casos, la expresión tanto de OPGL como de ODAR en la misma población celular puede crear un estímulo autocrino que afecta a la supervivencia de las células del mieloma. Así, en determinados
15 aspectos de la divulgación, la administración de un anticuerpo del OPGL puede reducir la supervivencia de las células tumorales, reduciendo o eliminando así la carga tumoral observada en los pacientes con mieloma.

En determinadas realizaciones, el invento proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo del OPGL, junto con un diluyente farmacéuticamente aceptable, un soporte, un solubilizador, un emulsionante, conservante y/o adyuvante.

20 En determinadas realizaciones, el invento proporciona una preparación farmacéutica; la preparación farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo del OPGL del invento y una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un agente terapéutico adicional, junto con un diluyente farmacéuticamente aceptable, un soporte, un solubilizador, un emulsionante, conservante y/o adyuvante. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional se puede seleccionar entre los factores morfogénicos del hueso denominados BMP-1 a BMP-12; el factor de crecimiento de transformación beta (TGF- β) y miembros de la familia TGF- β ; inhibidores de la
25 Interleucina-1 (IL-1), incluyendo, a título meramente enunciativo, IL-1ra y derivados de la misma y Kineret™ (anakinra), inhibidores de TNF α , incluyendo, a título meramente enunciativo, un receptor de TNF α soluble, Enbrel (etanercept) contra anticuerpos TNF α . Remicade™ (infliximab) y anticuerpo CJ2E7; hormona paratiroidea y análogos de la misma, proteína relacionada con la hormona paratiroidea y análogos de la misma; prostaglandinas de la serie E; bifosfonatos (como alendronato y otros); minerales importantes para los huesos, como el flúor y el calcio; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), incluyendo, inhibidores de COX-2, como Celebrex (cefecoxib) y Vioxx™ (rofecoxib); inmunosupresores, como el metratretaxato o la leflunomida; serin-proteasa como un inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores (SLPI); inhibidores de IL-6 (como anticuerpos de IL-6), inhibidores de 1L-8 (como anticuerpos de IL-8); inhibidores de IL-18 (por ejemplo, la proteína de enlace de 1L-18 o anticuerpos de IL-18); moduladores de la enzima de conversión de la Interleucina-1 (ICE); factores de crecimiento fibroblasto FGF-1 a FGF-10 y moduladores del FGF; antagonistas del PAF; un factor de crecimiento queratinocítico (KGF), moléculas relacionadas con el KGF y moduladores del KGF; moduladores de la metaloproteínasa de matriz (MMP); moduladores de la sintasa del óxido nítrico (NOS), incluyendo los moduladores de NOS inducible; moduladores del receptor de glucocorticoides, moduladores del receptor de glutamato, moduladores de los niveles de lipopolisacáridos (LPS); y noradrenalina y
30 moduladores y miméticos de la misma.

En determinadas realizaciones, los materiales aceptables de la fórmula preferiblemente son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de la fórmula para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, el índice de disolución o la liberación, la absorción o la penetración de la composición. En determinadas realizaciones, entre los materiales de la fórmula adecuados se incluyen, a título meramente enunciativo, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (como ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrógeno sulfito sódico); lampones (como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (como manitol o glicina); agentes quelantes (como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); material de carga; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (como glucosa, mañosa o dextrinas); proteínas (como sueroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes, aromatizantes y agentes diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones de formación de sal (como sodio); conservantes (como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosat, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y peróxido de hidrógeno); disolventes (como glicerina, glicol propilénico, glicol polietilénico); alcoholes de azúcar (como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; surfactantes o agentes humectantes como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbato como el polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes estabilizadores (como sacarosa o sorbitol); agentes tonificantes (como haluros metálicos alcalinos, preferiblemente sodio o cloruro potásico, manitol, sorbitol); vehículos portadores; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, A.R. Gennaro, ed. Mack Publishing Company (1990)).
60

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de OPGL y/o molécula terapéutica se une a un vehículo de extensión de semivida conocido en el campo. Estos vehículos incluyen, a título meramente enunciativo, el dominio Fe, glicol de polietileno y dextrano. Estos vehículos se describen, por ejemplo, en la solicitud estadounidense de la serie 09/428,082 y la solicitud PCT publicada n° WO 99/25044.

5 En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica óptima será determinada por un especialista cualificado en el campo, dependiendo, por ejemplo, de la vía y el formato de administración previstos y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. En determinadas realizaciones, estas composiciones pueden influir en El estado físico, la estabilidad, el índice de liberación *in vivo* y el índice de eliminación *in vivo de los* anticuerpos del invento.

10 En determinadas realizaciones, el soporte o vehículo primario de una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un soporte o vehículo adecuado puede ser el agua para la inyección, la solución salina fisiológica o fluido cerebroespinal artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para la administración parenteral. En determinadas realizaciones, el salino tamponado neutro o salino mezclado con sueroalbúmina son otros vehículos ejemplares. En
15 determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un tampón Tris de un pH aproximado de 7,0-8,5, o un tampón de acetato de un pH aproximado de 4,0-5,5, que también pueden incluir sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. En determinadas realizaciones, una composición que comprende un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se puede preparar para El almacenamiento mezclando la composición seleccionada con el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) en la forma de un ovillo liofilizado o una solución acuosa. Por otra parte, en determinadas
20 realizaciones, una composición que comprende un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se puede formular como un liofilizado utilizando excipientes apropiados, como la sacarosa.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas del invento se pueden seleccionar para la administración parenteral. En determinadas realizaciones, las composiciones se pueden seleccionar para la inhalación
25 o para la administración a través del tracto digestivo, como por vía oral. La preparación de estas composiciones farmacéuticamente aceptables le corresponde al especialista cualificado.

En determinadas realizaciones, los componentes de la fórmula están presentes en concentraciones aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, los tampones se utilizan para mantener la composición con un pH fisiológico o con un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un rango de pH de entre 5 y 8
30 aproximadamente.

En determinadas realizaciones, cuando se contempla una administración parenteral, una composición terapéutica puede adquirir la forma de una solución acuosa parenteral mente aceptable y sin pirógeno que comprenda el anticuerpo deseado del OPGL, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, un vehículo para la inyección parenteral es agua destilada estéril en la que
35 el anticuerpo del OPGL, con o sin un agente terapéutico adicional al menos, se formula como una solución isotónica, estéril, convenientemente conservada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, como microesferas inyectables, partículas bioerodibles, compuestos poliméricos (como ácido poliláctico y ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden permitir la liberación controlada o sostenida del producto que se podrá administrar posteriormente mediante una inyección de depósito. En
40 determinadas realizaciones, también se puede utilizar ácido hialurónico, que puede tener el efecto de fomentar la duración sostenida en la circulación. En determinados aspectos de la divulgación, se pueden emplear dispositivos de administración del fármaco implantables para introducir la molécula deseada.

En determinadas realizaciones, se puede formular una composición farmacéutica para la inhalación. En determinadas realizaciones, un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se podrá formular en forma de polvo seco para la inhalación. En determinadas realizaciones, una solución de inhalación con un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se podrá formular con un propelente para su administración mediante aerosol. En determinadas realizaciones, las soluciones se podrán nebulizar. La administración pulmonar también se describe en la solicitud PCT n° PCTVUS94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.
45

50 En determinadas realizaciones, se contempla que las formulaciones se podrán administrar por vía oral. En determinadas realizaciones, un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, administrado por esta vía, se podrá formular con o sin los portadores habitualmente utilizados en los compuestos de formas de dosificación sólidas, como tabletas y cápsulas. En determinadas realizaciones, se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la fórmula en el punto del tracto gastrointestinal donde la biodisponibilidad se maximiza y la degradación presistémica se minimiza. En determinadas realizaciones, se podrá incluir al menos un agente adicional para facilitar la absorción del anticuerpo del OPGL y/o cualquier agente terapéutico adicional. En determinadas
55 realizaciones, también se podrán emplear diluyentes, aromatizantes, ceras con un punto de fusión bajo, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegradores de tabletas y agentes ligantes.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica puede implicar una cantidad efectiva de anticuerpos

del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos adecuados para la fabricación de tabletas. En determinadas realizaciones, al disolver las tabletas en agua estéril, u otro vehículo apropiado, las soluciones se pueden preparar en forma de dosis unitarias. En determinadas realizaciones, entre los excipientes adecuados se incluyen, a título meramente enunciativo, diluyentes inertes, como carbonato cálcico, carbonato sódico o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes, como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los especialistas en el campo, incluyendo formulaciones que contienen anticuerpos del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en formulaciones de administración sostenida o controlada. En determinadas realizaciones, las técnicas para formular varios otros medios de administración sostenida o controlada, como portadores de liposomas, micro partículas bioerodibles o perlas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidas por los especialistas en el campo. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT n° PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados, como películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (patente estadounidense n° 773.919 y EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman y col., *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer y col., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) and Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), etilenoacetato de vinilo (Langer e/a., *supra*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988). En determinadas realizaciones, los compuestos de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden ser preparados por cualquiera de los procedimientos conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, Eppstein y col, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692(1985); EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

Por lo general, la composición farmacéutica que se utilizará para la administración *in vivo* es estéril. En determinadas realizaciones, esto se puede realizar mediante filtración a través de filtros de membrana estériles. En determinadas realizaciones, cuando la composición es liofilizada, la esterilización utilizando este procedimiento se puede realizar antes o después de la liofilización y reconstitución. En determinadas realizaciones, la composición para administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en una solución. En determinadas realizaciones, por lo general, las composiciones parenterales se ponen en un depósito con una entrada de referencia estéril, por ejemplo, un vial o una bolsa de solución intravenosa con un tope que se puede pinchar con una aguja hipodérmica.

En determinadas realizaciones, una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o en polvo deshidratado o liofilizado. En determinadas realizaciones, estas formulaciones se pueden almacenar en una forma preparada para la utilización o en una forma (por ejemplo, liofilizada) reconstituible antes de la administración.

El presente invento incluye kits para producir una unidad de administración monodosis. En determinados aspectos de la divulgación, los kits pueden contener cada uno un primer contenedor con una proteína deshidratada y un segundo contenedor con una fórmula acuosa. En determinados aspectos de la divulgación, se incluyen kits que contienen jeringas cargadas previamente, de una única cámara o multicámara (como jeringas para líquido y liofilizados).

En determinados aspectos de la divulgación, la cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que se empleará con fines terapéuticos dependerá, por ejemplo, de los objetivos y El contexto terapéutico. Un especialista en el campo apreciará que los niveles de dosis adecuados para el tratamiento variarán, dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que se va a utilizar El anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, la vía de administración, el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de los órganos) y/o estado (edad y salud general) del paciente. En determinados aspectos de la divulgación, el clínico podrá titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. En determinados aspectos de la divulgación, una dosis típica podrá oscilar desde unos 0,1 mg/kg hasta unos 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. En determinados aspectos de la divulgación, la dosis puede oscilar desde 0,1 mg/kg hasta unos 100 mg/kg; o 1 mg/kg hasta unos 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta unos 100 mg/kg.

En determinados aspectos de la divulgación, la frecuencia de dosificación tendrá en cuenta los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo del OPGL y/o agentes terapéuticos adicionales en la fórmula utilizada. En determinados aspectos de la divulgación, un clínico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. En determinados aspectos de la divulgación, por tanto, se puede administrar la composición como una única dosis o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) con el tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implantación o catéter. La dosis apropiada seguirá siendo ajustada rutinariamente por personas cualificadas en el campo y esto forma parte de sus tareas rutinarias. En determinados aspectos de la divulgación, las dosis apropiadas se pueden calcular mediante el uso de datos dosis-respuesta apropiados.

En determinados aspectos de la divulgación, la vía de administración de la composición farmacéutica se ajusta a procedimientos conocidos, por ejemplo por vía oral, mediante inyección intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o por vías intralesionales;

mediante sistemas de liberación sostenida o dispositivos de implante. En determinados aspectos de la divulgación, las composiciones se pueden administrar mediante inyección de bolos o infusión continua, o a través de un dispositivo de implante.

5 En determinados aspectos de la divulgación, la composición se puede administrar localmente, mediante el implante de una membrana, esponja u otro material apropiado en el que se haya absorbido o encapsulado la molécula deseada. En determinados aspectos de la divulgación, cuando se utilice un dispositivo de implante, el dispositivo puede ser implantado en cualquier órgano o tejido adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bofos de liberación prolongada o administración continua.

10 En determinados aspectos de la divulgación, puede ser recomendable utilizar una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, de forma *ex vivo*. En estos casos, las células, tejidos y/u órganos que han sido retirados del paciente son expuestos a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo del OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, después de lo cual las células, tejidos y/u órganos son implantados de nuevo en el paciente.

15 En determinados aspectos de la divulgación, un anticuerpo del OPGL y/o cualquier agente terapéutico adicional se puede administrar mediante la implantación de determinadas células diseñadas genéticamente, utilizando procedimientos como los descritos en el presente, para expresar y secretar los polipéptidos. En determinados aspectos de la divulgación, estas células pueden ser de animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. En determinados aspectos de la divulgación, las células se pueden inmortalizar. En determinados aspectos de la divulgación, al objeto de reducir las posibilidades de una respuesta inmunológica, las células se pueden encapsular para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. En determinados aspectos de la divulgación, los materiales de encapsulación son típicamente membranas o envoltentes poliméricos, semipermeables y biocompatibles que permiten la liberación del producto o productos de la proteína para impedir la destrucción de las células por parte del sistema inmunitario del paciente o por otros factores detrimentales de los tejidos circundantes.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados conseguidos, se ofrecen con fines ilustrativos únicamente y no se interpretará que limitan el presente invento.

Ejemplo 1

Clonación de las cadenas pesada y ligera de α OPGL-1

30 Las células CHO que expresan el cDNA de OPGL humano en toda su longitud se utilizan para inmunizar al ratón transgénico que contiene genes de inmunoglobulina humana. Los nódulos linfáticos del ratón inmunizado se fusionan con las células de mieloma murinas para generar hibridomas. Los sobrenadantes de las líneas del hibridoma se testan en un ensayo ELISA en busca de anticuerpos que reaccionan con el OPGL humano. Las líneas anti OPGL que expresan el hibridoma AMG_{6.5}, AMG_{6.4} y AMG_{6.1} expresan anticuerpos con una afinidad elevada con el OPGL (Kd de 0,28 nM, 0,29 nM y 0,23 nM, respectivamente), y AMG_{6.5} se selecciona para la clonación. Los clones de cDNA de la cadena pesada y ligera de AMG_{6.5} y AMG_{6.4} son idénticos, y AMG_{6.5} se utiliza para clonar el cDNA de la cadena ligera de α OPGL-1, mientras que AMG_{6.4} se utiliza para clonar el cDNA de la cadena pesada de α OPGL-1.

Clonación de la cadena ligera de α OPGL-1

40 La región variable de la cadena ligera kappa de α OPGL-1 se obtiene utilizando procedimientos de amplificación de la PCR del cDNA de la primera cadena preparado con el RNA total de AMG 6.5. El cDNA de la primera cadena se prepara con el RNA total de AMG_{6.5} utilizando un cebador aleatorio con un 5'-adaptador extendido (5'-GGCCGGATAGGCCTCACNNNNNT-3' (SEQ ID NO: 15)) y los materiales y procedimientos que ofrece el kit Gibco Superscript II™ Pre-amplification System for First Strand cDNA Synthesis (cat. N° 18089-011). Los siguientes oligonucleótidos se utilizan para la PCR:

Cebador 5' kappa RACE

45 5' - GAT GAC CCA GTC TCC AGC CAC CCT G - 3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador 3' kappa RACE

5' - AAG GGT CAG AGG CCA AAG GAT GG - 3' (SEQ ID NO: 6)

50 Los DNAs amplificados son clonados en pCRU-TOPO (Invitrogen) y los plásmidos resultantes son secuenciados. La secuencia consensuada de la cadena kappa se utiliza para designar cebadores para la amplificación de la PCR de la cadena kappa de α OPGL-1 en toda su longitud. El cebador 5' α OPGL-1 kappa incorpora un sitio XbaI (TCTAGA) para la clonación y una secuencia Kozak "CCACC" antes del Met codón de iniciación. El cebador 3' α OPGL-1 kappa incorpora un sitio SaI (GTCGAC) tras el codón de terminación para el clonado.

Cebador 5' α OPGL-1 kappa:

5'-CAA CTC TAG A CC ACC ATG GAA ACC CCA GCG-3' (SEQ ID NO: 7)

Sitio XbaI Kozak M E T P A (SEQ ID NO: 16)

Cebador 3' αOPGL-1 kappa

5'-TTT GAC GTC GAC TTA TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA G -3' (SEQ ID NO: 8)

Sitio SmaI * * C E G R N F (SEQ ID NO: 17)

- 5 El clon de cDNA de la cadena kappa de αOPGL-1 en toda su longitud se obtiene utilizando el cDNA de la primera cadena de AMG 6.5, anteriormente descrito, mediante la amplificación de la PCR con los cebadores kappa 5' y 3' de αOPGL-1. La reacción PCR genera un fragmento de 738 bp que codifica los 235 residuos de aminoácidos (incluyendo la secuencia de la señal de la cadena kappa de 20 aminoácidos) de la cadena kappa de αOPGL-1. (Figura 4, SEQ ID NO: 4). Tras la purificación con un kit QIAquick PCR Purification (Qiagen cat. n° 28104), este fragmento se utiliza para construir el vector de expresión de la cadena ligera kappa.
- 10 El fragmento kappa en toda su longitud de 738 bp anteriormente generado se corta con XbaI y SmaI, se purifica utilizando el sistema Promega Wizard DNA Clean-Up System (Promega cat. n° A7100), y se clona en pDSRa19 para generar plásmido αOPGL-1-kappa/pDSRct19 (Figura 5). pDSRa19 se ha descrito anteriormente (véase WO 90/14363 (véase, por ejemplo, la Figura 12)). En resumen, para hacer pDSRa19, pDSRa2 se modifica de (as siguientes maneras: FSH poliA se reduce en unos 1400 pares de bases, hasta 885 pares de bases, y ahora acaba en el sitio NdeI; el promotor del dihidrofolato reductasa (DHFR) contiene ahora 209 pares de bases, tras haber sido reducido del 5' extremo en aproximadamente una kilobase; y se elimina de la secuencia DHFR poliA un fragmento BGIII de unos 550 pares de bases.
- 15

- 20 El clon de expresión de la cadena ligera kappa de αOPGL-1 es secuenciado para confirmar que se ha codificado para el mismo péptido identificado en el hibridoma AMG 6.5. El vector de expresión final, αOPGL-1-kappa/pDSRa19, es 5476 bp y contiene las 7 regiones funcionales mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de αOPGL-1-kappa/pDSRa19

Base del plásmido

Número de pares

2 a 881

A transcription termination/polyadenylation signal from the α-subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormone (α-FSH) (Goodwin, y col, Nucleic Acids Res. 1983 11: 6873-82; G; Número de referencia a Genbank X00004)

882 a 2027

A mouse dihydrofolate reductase (DHFR) minigene containing the endogenous mouse DHFR promoter, the cDNA coding sequences, and the DHFR transcription termination/polyadenylation signals (Gasser y col, Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 79: 6522-6.; Nunberg et al, Cell 1980 19:355-64; Setzer y col, J Biol Chem. 1982 257: 5143-7; McGrogan y col, J Biol Chem. 1985 260: 2307-14)

2031 a 3947

pBR322 sequences containing the ampicillin resistance marker gene and the origin for replication of the plasmid in E. coli (Número de referencia a Genbank J01749)

3949 a 4292

An SV40 early promoter, enhancer and origin of replication (Takebe y col, Mol Cell Biol. 1988 8: 466-72., Número de referencia a Genbank J02400)

4299 a 4565

A translational enhancer element from the HTLV-1 LTR domain (Seiki y col, Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 80: 3618-22, Número de referencia a Genbank J02029)

4574 a 4730

An intron from the SV40 16S, 19S splice donor/acceptor signals (Okayama and Berg, Mol Cell Biol. 1983 3: 280-9, Número de referencia a Genbank J02400)

4750 a 5476

El cDNA de la cadena ligera kappa del αOPGL-1 entre los sitios XbaI y SmaI

En la Figura 5 se muestra el mapa circular del plásmido del vector.

Clonación de la cadena pesada del αQPGL-1

- 25 La cadena pesada de αOPGL-1 IgG2 se dona del cDNA de cadena doble del hibridoma AMG 6.4 producido con el kit Clontech Marathon™ cDNA Amplification (cat. n° K1802-1). La amplificación del cDNA de la cadena pesada de AMG 6.4 se realiza mediante las técnicas de los extremos de cDNA de amplificación rápida 5' y 3' (RACE) realizadas con cebadores específicos de la región constante de la cadena pesada de IgG2 de la línea germinal humana (mostrados a continuación) y cebadores RACE, y otros materiales y procedimientos proporcionados en el kit de amplificación Marathon™ cDNA.

- 30 Cebador 5' IgG2 RACE

5'- GGC ACG GTC ACC ACG CTG AG -3' (SEQ ID NO: 9)

Cebador 3'lgG2 RACE

5'- CCT CCA AGG GCC CAT CGG TCT -3' (SEQ ID NO: 10)

El producto de 600 bp 5' RACE y el producto de 1200 bp 3' RACE se clonan en pCR2.1 (Invitrogen) y son secuenciados. La información de esta secuencia se utiliza para diseñar cebadores específicos de la cadena pesada de α OPGL-1 para el clonado de la secuencia en toda su longitud. El cebador 5' de la cadena pesada (5' α OPGL-1 IgG2 Primer) se dirige contra la cadena homocodificada y tiene un sitio HindIII y una secuencia consensuada Kozak antes del sitio de inicio natural. El cebador 3' de la cadena pesada (3' α OPGL-1 IgG2 Primer) es un cebador antisentido que contiene un sitio *Sal*I y un codón de terminación tras El último aminoácido de la secuencia de IgG2 de la cadena pesada.

10 Cebador 5' α OPGL-1 IgG2:

5'- CAGAAGCTTGACCACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GC -3'

(SEQ ID NO: 11)

***Hind*III Kozak M E F G L S W L F L V A**

(SEQ ID NO: 18)

Cebador 3' α OPGL-1 IgG2:

5'- GCA TGTCGAC TTA TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG -3' (SEQ ID NO: 12)

***Sal*I * * K G P S L S L (SEQ ID NO: 19)**

15 El cDNA de cadena doble descrito anteriormente se utiliza para generar el cDNA de cadena pesada en toda su longitud mediante amplificación PCR con los cebadores 5'- y 3'- α OPGL-1 IgG2. La reacción PCR genera un fragmento de 1433 bp que codifica los 467 residuos de aminoácidos (incluyendo la secuencia de la señal de IgG de 19 aminoácidos) de la proteína de cadena pesada de α OPGL-1 IgG2 (Figura 2, SEQ ID NO: 2). Tras la purificación con un kit QIAquick PCR Purification (Qiagen cat. n° 28104), este fragmento se utiliza para construir el vector de expresión de la cadena pesada como sigue.

20 El DNA que codifica el fragmento pesado de IgG2 en toda su longitud anteriormente generado se corta con *Hind*III y *Sa*I, purificado con un kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen cat. n° 28704), y este fragmento se clona en pDSRa19. El plásmido de expresión resultante se denomina α OPGL-1-IgG2/pDSRo19 (Figura 6). Todos los componentes del vector son idénticos al vector α OPGL-1-kappa/pDSRa19, anteriormente descrito, salvo porque El cDNA de cadena pesada de α OPGL-1 IgG2 sustituye al cDNA de cadena ligera kappa α OPGL-1 entre los sitios *Xba*I y *Sa*I. El clon de expresión de la cadena pesada α OPGL-1 IgG2 es secuenciado para confirmar que se ha codificado para El mismo polipéptido identificado en el hibridoma AMG 6.4.

Ejemplo 2

Expresión de α OPGL-1 en células CHO

30 La expresión estable de un anticuerpo de α OPGL-1 se consigue mediante cotransfección de plásmidos α OPGL-1-kappa/pDSRa19 y α OPGL-1 -IgG2/pDSRa19 a células ováricas de hámster chino deficientes en reductasa dihidrofolato (DHFR-) (CHO AM-1/D, patente estadounidense n° 6.210.924), para después aislar y testar los clones individuales.

35 En una placa de cultivo de tejidos de 100 mm se colocan células 1.5×10^6 AM-1/D desarrolladas en un medio CHO d" (DMEM con alta glucosa, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/ estreptomycin/glutamina, 1X NaPiruvato, 1% aminoácidos no esenciales (NEAA))(Gibco®) y 1% suplemento ht (Gibco®)) El día antes de las transfecciones (Día 0). El día 1, se alicuotan 400 μ l de medio RPMI 1640 libre de suero (Gibco®) en un tubo de polipropileno de 12x75 mm. Se añaden veinticuatro microlitros del reactivo TransIT®-LT1 (Mirus Corporation) gota a gota al medio y se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se añade un total de 15 μ g de DNA del plásmido linealizado (7,5 μ g de α OPGL-1-kappa/pDSRa19 y 7,5 μ g de α OPGL-1 -IgG2/pDSRa19, digerido con *Pvu*1) gota a gota a la mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos.

40 Se retira el medio CHO d- de las células, que se lavan con 10 ml de tampón fosfato salino Dulbecco (Gibco®). Se añaden a las células seis mililitros de medio MEM libre de suero complementado con HT, L-glu, NEAA, y Na piruvato (Gibco®). Se añade el complejo DNA/LT1 gota a gota a las placas, que se agitan suavemente adelante y atrás para distribuir el DNA de forma uniforme por las células. Después de seis horas en una incubadora de cultivo de tejidos, el medio es sustituido por un medio CHO d- nuevo. Cuarenta y ocho horas más tarde las células se dividen en 10 placas

de cultivo de 100 mm en el medio CHO seleccionado (DMEM con alta glucosa, 10% suero bovino fetal dializado (FBS), 1% penicilina /estreptomicina /glutamina, 1 % aminoácidos no esenciales y 1X Na piruvato) (Gibco®). El medio se cambia dos veces por semana hasta que aparezcan las colonias.

- 5 Después de 10-14 días, se recogen las colonias utilizando discos de clonado de 5 mm (Labcore®) humedecidos con 1x tripsina-EDTA (Gibco®) y se cultivan en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos con el medio CHO seleccionado. Cuando las células sean confluentes, se añaden medios libres de suero (medio CHO seleccionado menos FBS) y se recogen 48 horas después. Estos medios condicionados son *analizados* en busca de la expresión del anticuerpo mediante la prueba de Western-Blot con peroxidasa del rábano (HRP)-anticuerpo de cabra contra IgG Fe humana conjugada (Pierce, Rockford, IL) para detectar la cadena pesada de α OPGL-1, y anticuerpo de la cadena kappa de cabra anti-humana (Pierce, Rockford, IL) seguido de anticuerpo IgG(H+L) de conejo anti-cabra conjugado con HRP (Pierce, Rockford, IL) para detectar la cadena ligera de α OPGL-1. Los clones de mayor expresión se expanden y almacenan en nitrógeno líquido.

Ejemplo 3

Producción de α OPGL-1

15 Preparación y creación de la línea celular 125Q

- Las células CHO que producen α OPGL-1 se clonan en dos rondas de dilución limitadora en placas de 96 pocillos en condiciones libres de suero. Los clones se seleccionan basándose en las características de producción y crecimiento en diversos vasos de suspensión. Se realizan EIAs para seleccionar el clon que produce el máximo nivel de α OPGL-1. Las características de crecimiento, incluyendo los tiempos de duplicado y las densidades se miden entonces mediante el desarrollo de clones en matraces de agitación de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l y 3 l, así como en biorreactores Aplikon de 3 l. Se selecciona el clon con el tiempo de duplicado menor que alcanza la máxima densidad en el cultivo, que se denomina Línea celular 125Q. Cuando el clon se ha expandido para producir suficientes células como para congelar 360 ampollas de unas 1×10^7 células/ml, las células se suspenden de nuevo en un medio crio preservativo libre de suero (90% medio VM-Soy Batch (véase la Tabla 3 para más información) complementado con 10 ml/L de aminoácidos no esenciales y 10 ml/L L-glutamina (Gibco/LTI/Invitrogen), y 10% dimetil sulfóxido (JT Baker)) y se congelan. Las ampollas se almacenan en un lugar de referencia restringido y se sumergen en nitrógeno líquido en frascos Dewar para nitrógeno líquido.

Basándose en el crecimiento y la producción en matraces de pequeña escala y biorreactores de mayor escala, la línea celular 125Q se selecciona como la línea celular para la fabricación de α OPGL-1.

30 Cultivo de células

- α OPGL-1 se produce por expresión en la línea celular 125Q, una línea clonal de células CHO que expresa α OPGL-1 de plásmidos α OPGL-1-kappa/pDSRa19 y α OPGL-1 ~IgG2/pDSRa19. El proceso de cultivo celular para α OPGL-1 se muestra en la Figura 19. Para cada ronda de producción, las células de un vial de la línea celular 125Q se desarrollan inicialmente en 50 ml de medio VM-Soy Batch (véase la Tabla 3 para ver la composición) complementado con 10 ml/l de aminoácidos no esenciales y 10 ml/L L-glutamina (Gibco/LTI/Invitrogen) (VM-Soy Supp) en matraces de Erlenmeyer de 125 ml a 100 rpm durante 5 días. Entonces la totalidad del cultivo se utiliza para inocular VM-Soy Supp en un matraz de agitación para 3×10^5 células viables/ml ($3E5$ vc/ml), y se centrifuga a 70 rpm durante 3-4 días. Entonces la totalidad del cultivo del matraz de agitación de 500 ml se utiliza para inocular VM-Soy Supp en un matraz de agitación de 3 l para $3E5$ vc/ml, y se centrifuga a 70 rpm durante 3-4 días.

- 40 El cultivo del matraz de agitación de 3 l se divide entonces en dos matraces de agitación de 3 l [a $3E5$ vc/ml en VM-Soy Supp sin fenol rojo y se desarrolla en las mismas condiciones. Entonces se utilizan los cultivos de los matraces de agitación para inocular otros cuatro matraces de agitación a $3E5$ vc/ml en VM-Soy Supp sin fenol rojo y se desarrollan en las mismas condiciones. Se utilizan cuatro litros de cultivo de los matraces de agitación de 3 l para inocular 10 l de VM-Soy Supp sin fenol rojo en un biorreactor de 20 l, y se activa El biorreactor en modo de alimentación continua (*fed-batch*) durante 7 a 10 días. En modo de alimentación continua, se añade un nutriente que contiene los componentes de los medios concentrados («Alimentación» en la Tabla 3 más abajo) para mantener el desarrollo celular y la viabilidad del cultivo.

- 50 Todo el cultivo del biorreactor de 20 l se utiliza a continuación para inocular 70 l de VM-Soy Supp sin fenol rojo en un biorreactor de 150 l, y se activa el biorreactor en modo de alimentación continua (*fed-batch*) durante 9 a 10 días. Finalmente, todo el cultivo del biorreactor de 150 l se utiliza para inocular unos 880 l de VM-Soy (sin suplemento ni fenol rojo) en un biorreactor de 2000 l, y se activa el biorreactor en modo de alimentación continua. La velocidad de alimentación en este modo se determina de forma que el nivel de glucosa del cultivo se mantenga a 0,6 g/l para cada biorreactor. La densidad celular y la concentración de glucosa se miden diariamente a la velocidad de alimentación convenientemente ajustada.

- 55 La producción en el biorreactor de 2000 l dura unas dos semanas, durante las que se produce constitutivamente α OPGL-1 por parte de las células y se secreta en el medio de cultivo celular.

El reactor de producción se controla al pH, la temperatura y el nivel de oxígeno disuelto seleccionados: el pH es 7.0 y se controla mediante la adición de gas dióxido de carbono y carbonato sódico; el oxígeno disuelto es 120 mmHg y se controla mediante flujos de aire, nitrógeno y oxígeno. Las células se mantienen a 37°C durante todo el proceso. Todos los gases pasan por filtros de membrana con un tamaño de poros de 0,22 µm o inferior.

- 5 Al final de la producción, el cultivo celular se introduce en una centrifugadora multidisco y el sobrenadante se separa de las células. El centrifugado se filtra también con un filtro Cuno 90SP seguido de un filtro Posidyne de 0,2 µm (Pall Co.). Los medios acondicionados filtrados se concentran después mediante ultrafiltración (UF) de flujo tangencial utilizando membranas de 50kD NMWL (Millipore Biomax 50). Los medios acondicionados se concentran entre 15 y 30 veces. El medio acondicionado concentrado (CCM) resultante se procesa después mediante purificación o se congelan para su purificación en una fecha posterior. El proceso de producción se resume en la Figura 19.

Medio para el cultivo de células

- 15 El medio para el cultivo de células que se utilizará durante todo el proceso de cultivo se basa en el medio de Eagle modificado por Dulbecco/Nutriente de Ham F12 (DMEM/F12, 1:1), y contiene niveles complementarios de aminoácidos, sales y nutrientes adicionales, un hidrolizado de soja e insulina humana recombinante (Nucellin®Zn, Eli Lilly). Los componentes se recogen en la Tabla 3. Estos medios se denominan VM-Soy. Las soluciones de los medios se filtran a través de filtros de membrana con un tamaño de poros de 0,2 µm antes de su utilización.

Tabla 3. Componentes de los medios para el cultivo de células

COMPONENTES PARA EL MEDIO BASAL Y ALIMENTACIONES		
COMPONENTE	Medio VMSoy (mg/l)	ALIMENTACION (mg/l)
COMPONENTES DMEM/F12		
Sales inorgánicas		
CaCl ₂ (anhid.)	116,60	233,2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0026	0,0052
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,1000	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,8340	1,668
KCl	311,80	623,6
MgCl ₂ (anhid.)	57,280	114,56
MgSO ₄ (anhid.)	97,680	195,36
NaCl	905,990	1811,98
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125,00	250
Na ₂ HP0 ₄	142,040	284,08
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,8640	1,728
Otros componentes		
D-Glucosa	3151,00	12302
Na Hipoxantina	5,40	10,8
Ácido linoleico	0,090	0,18
Ácido lipoico	0,2060	0,412
Fenol rojo	8,10	16,2
Putrescina 2HCl	0,1620	0,324
Piruvato de sodio	110,00	220

(continuación)

Aminoácidos		
L-Alanina	26,70	53,4
L-Arginina HCl	295,00	590
L-Asparagina.H ₂ O	45,00	90
L-ácido aspártico	39,90	79,8
L-Cisteína.HCl.H ₂ O	35,120	70,24
L-Cisteína.2HCl	62,580	125,16
L-ácido glutámico	44,10	88,2
L-Glutamina	657,00	1314
Glicina	52,50	105
L-Histidina.HCl.H ₂ O	62,950	125,9
L-Isoleucina	108,940	217,88
L-Leucina	118,10	236,2
L-Lisina HCl	182,50	365
L-Metionina	34,480	68,96
L-Fenilalanina	70,960	141,92
L-Prolina	57,50	115
L-Serina	73,50	147
L-Treonina	106,90	213,8
L-Triptofán	18,040	36,08
L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	111,580	223,16
L-Valina	105,70	211,4
Vitaminas		
Biotina	0,0073	0,0146
D-Ca-pantotenato	4,480	8,96
Cloruro de colina	17,960	35,92
Ácido fólico	5,30	10,6
I-Inositol	25,20	50,4
Niacinamida	4,040	8,08
Piridoxal HCl	4,00	8
Piridoxina HCl	0,0620	0,124
Riboflavina	0,4380	0,876
Tiamina HCl	4,340	8,68
Timidina	0,3635	0,727
Vitamina B12	1,360	2,72
COMPONENTES ADICIONALES		
Nuceilin Zn, (rhu-insulina)	5,00	15
Ácido selenioso	0,0050	0,015
Etanolamina	0,0012	0,0037
Triyodotironina	0,000040	0,00012
Hidrocortisona	0,020	0,06
Citrato férrico	122,450	122,450
Plurónico F-68	1000,00	500
Hidrolizado de soja	6000,00	6000,00
NaHCO ₃	3000,00	3000,00
NaCl	3500,00	

Se secreta α OPGL-1 expresado en células CHO en el medio extracelular. Se pueden seguir varios pasos para generar material puro. El proceso utiliza inducción de carga hidrófoba, intercambio catiónico y cromatografía de interacción hidrófoba junto con un pH bajo y un filtro viral. Estos procedimientos se describen a continuación.

A. Cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HC1C)

- 5 Este paso de cromatografía elimina la mayoría del DNA y las proteínas de la célula huésped. Los medios acondicionados concentrados (CCM) se filtran con un filtro Cuno 30SP, después con un filtro de celulosa cargado Cuno VR07 y, a continuación, se cargan en una resina MEP HyperCel. Después de la carga, la columna se lava con un tampón de equilibrado (20 mM Tris pH 7,2). El anticuerpo se eluye de la resina con un tampón de pH bajo (20 mM de acetato sódico, pH 5,0). Cuando se eluye de la columna, el producto se recoge basándose en la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna.

B. Inactivación viral

El depósito de MEP se ajusta a un pH 3,7 y se espera durante unos 60 minutos para desactivar retrovirus potencialmente contaminantes. Tras la espera, se ajusta el pH a 6.0 aproximadamente.

C. Filtración viral

- 15 El depósito de pH ajustado se filtra a través de un filtro Millipore Viresolve NFR o equivalente. El anticuerpo fluye a través del filtro mientras que se contienen los virus potencialmente contaminantes ≥ 50 nm.

D. Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

- 20 Posteriormente el anticuerpo se purifica mediante cromatografía de intercambio catiónico, utilizando SP Sepharose HP (Amersham Pharmacia) o equivalente. El paso de la cromatografía de intercambio catiónico elimina otras proteínas de la célula CHO, DNA, proteínas de bajo peso molecular y formas agregadas de α OPGL-1. El depósito del que se han filtrado los virus se carga en la resina de intercambio catiónico. Después de la carga, la columna se lava con un tampón de equilibrado (20 mM NaMES pH 6,2). A continuación, se eluye el anticuerpo con un gradiente lineal o aumentando la sal (20 mM NaMES pH 6,2, 0 M NaCl a 20 mM NaMES pH 6,2, 0,3 M NaCl). Cuando se eluye de la columna, el producto se recoge basándose en la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna.

25 E. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

- El anticuerpo se purifica también mediante cromatografía de interacción hidrófoba utilizando fenil Toyopearl 650S (Tosoh Biosep) o equivalente. La cromatografía de interacción hidrófoba se utiliza como paso de perfeccionamiento y elimina las proteínas adicionales de las células, CHO, DNA, proteínas de bajo peso molecular y formas agregadas de α OPGL-1. El depósito de intercambio catiónico se acondiciona antes de la carga en la columna, añadiendo sulfato amónico hasta una conductividad de >105 mS/cm a 15-25°C. Después de la carga, la columna se lava con el tampón de equilibrado (1M fosfato de potasio pH 8). Posteriormente el anticuerpo se eluye con un gradiente lineal de concentración de sal decreciente (1M fosfato de potasio, 0mM Tris pH 8 a 0M fosfato de potasio, 20 mM Tris pH 8). Cuando se eluye de la columna, el producto se recoge basándose en la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna.

35 F. Concentración y diafiltración

El depósito de la columna HIC se concentra y diafiltra en el tampón de formulación mediante ultrafiltración de lujo tangencial, utilizando membranas de 50 kD NMWL (Millipore Biomax 50). El tampón de formulación incluye 10 mM acetato, 5% sorbitol, pH 5,2 y α OPGL-1 se encuentra a 30 mg/ml

Filtración final y almacenamiento

- 40 El producto purificado se pasa a través de un filtro de 0,22 μ m PVDF (Millipore), se toman muestras y se almacena aproximadamente a -30°C en un frigorífico seguro.

Ejemplo 4

Especificidad de la unión de un α OPGL-1

- 45 Los anticuerpos producidos en células CHO que son transfectados con los dos vectores de expresión debatidos en los Ejemplos 1 y 2 se pueden utilizar en los siguientes ejemplos 4, 5 y 6.

La OPG humana se une y neutraliza el OPGL en ratas, ratones y monos cangrejeros, así como en humanos. El α OPGL-1 se une y neutraliza el OPGL con gran afinidad, pero no se une significativamente al murino (Tabla 4).

Tabla 4: Afinidad de α OPGL-1 al OPGL expresado en la membrana celular de la secuencia humana, del mono cangrejero o el ratón.

Especies OPGL	α OPGL~1 ED ₅₀ (ng/ml)
Humana	16
Mono cangrejero	19
Ratón	Sin unión específica.

El OPGL de estas especies se expresa en células CHO como la proteína unida a la membrana en su longitud total. La unión del α OPGL-1 al OPGL expresado en la superficie celular se evalúa mediante análisis FAC de células incubadas con α OPGL-1 y un anticuerpo secundario etiquetado FICT de la IgG2 humana, α OPGL-1 se une al OPGL humano y de mono cangrejero, pero no hay una unión específica al OPGL de ratón.

Por otra parte, se ha informado de que la OPG humana muestra una débil unión al ligando que induce la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) (Truneh y col, 2000), un miembro relacionado de la familia TNF, que muestra la homología de la secuencia del aminoácido y DNA con el OPGL (Lacey y col., 1998). Sin embargo, la OPG no se une de forma detectable a otras proteínas relacionadas con el TNF, como TNF α , TNF3 o ligando CD40.

α OPGL-1 se une específicamente al OPGL en las placas EIA (Figura 7), El OPGL recombinante soluble (2 μ g/ml) está revestido en placas EIA de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. Después del bloqueo con 1% BSA en PBS, diversas concentraciones de α OPGL-1 (aproximadamente 2 ng/ml para 1000 ng/ml) diluidas en 1% BSA/PBS se añaden a los pocillos y las placas se incuban durante unas dos horas a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detecta con IgG (Fab')-HRP de cabra anti-humano utilizando el cóctel de sustratos TMB-H202 (tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno). La absorbancia se lee a 450nm y 650nm.

α OPGL-1 se une específicamente al OPGL expresado en la superficie de las células transfectadas (Figura 8). α OPGL-1(100 ng/ml) diluido en un tampón de FACS (PBS, 0,1%BSA, 0,01% azida de sodio) se preincuba con diversas concentraciones de ligando de OPGL, TNF α , TNF β , TRAIL, o CD40 (aproximadamente 0,1 ng/ml para 1000 ng/ml) y, a continuación, se añaden aproximadamente 200.000 células CHO REN 218-9, que son células CHO que expresan de forma estable el OPGL unido a la membrana en la superficie de la célula. Después de una hora a 2-8°C el anticuerpo no unido se elimina por centrifugación y lavado. Posteriormente, las células se incuban durante 30 minutos a 2-8°C con IgG de cabra F(ab')₂ anti-humana etiquetada FITC (específica del fragmento de Fey). Después de la centrifugación y el lavado, la fluorescencia de la superficie de la célula se mide utilizando una citometría del flujo. La Figura 8 muestra que la unión de α OPGL-1 a las células CHO REN 218-9 es específica y se reduce competitivamente mediante la adición de OPGL soluble, pero no mediante la adición de un ligando de TNF α , TNF β , TRAIL o CD40.

En experimentos de competencia, la unión de α OPGL-1 a OPGL en placas EIA se inhibe mediante la adición de OPGL exógeno (Figura 9), pero no mediante la adición de un ligando de TNF α , TNF β , TRAIL o CD40 (Figura 10). Este procedimiento se realiza fundamentalmente del mismo modo que se ha indicado arriba, para la unión de α OPGL-1 a OPGL en placas EIA, salvo por que una concentración constante de α OPGL-1 (100 ng/ml) se preincuba con diversas concentraciones de OPGL soluble u otros ligandos (aproximadamente 1 ng/ml para 1000 ng/ml para cada uno) antes de su adición a las placas revestidas de OPGL.

Ejemplo 5

Actividad neutralizadora del α OPGL

Inhibición de la formación de osteoclasto

RAW 264.7 (ATCC n° TIB-71, Manassas, VA) es una línea celular macrófaga murina que se obtuvo del tumor inducido por un virus de la leucemia murina de Abelson. Las células RAW 264.7 diferenciarán las células tipo osteoclasto en presencia de OPGL. El ensayo básico para la generación de osteoclastos en el cultivo de células RAW en presencia de OPGL se ha descrito con detalle en Simonet y col (1997) Cell 89 p. 309, y Lacey y col (1998) Cell 93 p. 165-.

Las células RAW son estimuladas por el ligando para diferenciar las células tipo osteoclasto y la diferenciación se puede medir mediante la actividad TRAP, una propiedad de los osteoclastos. De este modo, se puede medir el efecto de α OPGL-1 sobre la osteoclastogénesis.

Las células RAW se incuban durante 4 días en presencia de una cantidad constante de OPGL (40 ng/ml) y diversas cantidades de α OPGL-1 (6,3 ng/ml para 200 ng/ml) en el medio de cultivo celular (DMEM, 10% FBS, 0,292 mg/ml L-Glut, 100 unidades/ml penicilina G, 100 μ g/ml sulfato de estreptomycin). Al terminar los cuatro días, se tiñen las células para ver la actividad de la fosfatasa acida tartrato resistente (TRAP) mediante permeabilización y acidificación, seguido del tratamiento con paranitrofenilfosfato durante 5 minutos. Brevemente, se aspira el medio de las células y se añaden 100 μ l de tampón de citrato (410 ml 0,1M ácido cítrico, 590 ml 0,1 M citrato, sal de trisodio, 1 ml tritón X-100) en cada pocillo, para después incubar las placas durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 100 microlitros de solución PNPP (157,8 mg de reactivo de fosfatasa acida (Sigma 104-100), 7,2 ml de solución de tartrato (Sigma cat no. 387-3), y 22,8 ml de tampón de citrato), y las placas se incuban durante 3 a 5 minutos a

temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de 50 µl 0,5 M NaOH.

TRAP convertirá el paranitrofenilfosfato en paranitrofenol, que se puede cuantificar mediante medición óptica de la densidad a 405 nm. La actividad de TRAP, que es un marcador secundario para el desarrollo de osteoclasto, se correlaciona con la densidad óptica a 405 nm. En la Figura 11 se muestra un cuadro de densidad óptica frente a la concentración de αOPGL-1 y demuestra que el αOPGL-1 inhibe la formación de osteoclasto en este ensayo.

Inhibición de la unión de OPGL a su receptor

La potencia de αOPGL-1 está demostrada por su capacidad para bloquear la unión del ligando de OPG a su receptor cognado, el receptor de diferenciación y activación del osteoclasto (ODAR, también conocido como RANK). Este ensayo utiliza la resonancia de fluorescencia de resolución temporal homogénea (HTRF) para detectar la unión de un αOPGL-1 al ligando de osteoprotegerina conjugado con europio (Eu-OPGL). Si αOPGL-1 inhibe la unión de Eu-OPGL a ODAR, el efecto fluorescente descenderá y la cantidad de αOPGL-1 presente estará inversamente relacionada con la cantidad de fluorescencia.

El OPGL está etiquetado con europio, que emite luz a 620 nm cuando se excita con luz a 337 nm. ODAR se fusiona con FLAG y Fe, y la proteína de fusión Fc-ODAR-FLAG se etiqueta con un anticuerpo anti-FLAG unido a la alofocianina (APC), un fluoróforo que emite luz a 665 nm cuando se excita con luz a 620 nm. Por lo tanto, cuando el ligando de OPG etiquetado con europio se une al complejo Fc-ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC, el complejo terciario emitirá 665 nm de luz cuando se excite con luz a 337 nm.

Eu-OPGL a 0,05 µg/ml se preincuba con diversas concentraciones (0,1 a 150 ng/ml) de αOPGL-1 en tampón de ensayo (50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 0,05% Na₃, 0,1% BSA, y 0,05% Tween 20) a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora (mezcla de preincubación). También se prepara una mezcla de Fc-ODAR-FLAG (1 µg/ml) y anti-FLAG-APC (2,5 µg/ml) en tampón de ensayo y se incuba a temperatura ambiente durante una hora (mezcla de fluorocromo). A continuación se combinan volúmenes iguales de la mezcla de preincubación y la mezcla de fluorocromo, y se incuban a temperatura ambiente durante 3 horas. La fluorescencia se mide leyendo las placas en el analizador de microplacas Packard Discovery HTRF utilizando una longitud de onda de excitación de 337 nm y una longitud de onda de emisión de 665 nm.

Cuando se preincuba αOPGL-1 con el ligando Eu-OPG y a continuación se mezcla con Fc-ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC, la intensidad de fluorescencia a 665 nm desciende de forma dependiente de la dosis, como se muestra en la Figura 12, demostrando que αOPGL162 puede inhibir efectivamente la unión de OPGL a ODAR.

Ejemplo 6

Farmacocinética en monos cangrejeros

Seis machos y seis hembras de monos cangrejeros, no mayores de 4,5 años y peso de 2 a 4 kg se asignan a 4 grupos de dosis. El grupo 1 consta de 3 machos y 3 hembras. Los grupos 2, 3 y 4 constan de un macho y una hembra cada uno. A los animales del grupo 1 se les administra una única dosis SC de 1 mg/kg αOPGL-1, mientras que a los animales de los grupos 2, 3 y 4 se les administra una única dosis IV de 0,1, 1,0 o 10,0 mg/kg de αOPGL-1, respectivamente.

A los animales se les administra αOPGL-1 expresado de células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas. Se toman muestras séricas para determinar los niveles de αOPGL-1, el análisis del anticuerpo y el análisis del N-telopéptido sérico marcador de la renovación de hueso (N-Tx sérico), fosfatasa alcalina (ALP) y calcio sérico (Ca sérico). También se recoge orina para el análisis de N-telopéptido (N-Tx en orina) y creatinina.

Los perfiles de tiempo-concentración sérica tras la administración IV se caracterizan por una distribución trifásica (Figura 13). Inicialmente se produce una fase de distribución rápida, seguida de una fase de estancamiento significativamente inferior, que parece ser dependiente de la concentración. La tercera fase observada es una fase de eliminación rápida.

El análisis no compartimental de los perfiles completos de tiempo-concentración sérica utilizando WinNonlin Professional (v1.5), y el análisis exponencial de los datos hasta 14 días después de la administración de artículo de prueba y por encima de 10.000 ng/ml utilizando SAAM II (v1.1.2) se utilizan para investigar la farmacocinética de αOPGL-1 en monos. El volumen inicial de la distribución de todas las dosis IV es de 28,9 ml/kg de media, similar al volumen de plasma. El volumen de estado constante (V_{ss}) de distribución es de 39 ml/kg de media en todas las dosis IV. El análisis exponencial indica que αOPGL-1 tiene una vida media de distribución ($t_{1/2\alpha}$) de 6,02 horas, una fase secundaria extendida con una vida media ($t_{1/2\beta}$) que aumenta con la dosis de 86,9 horas a una dosis de 0,1 mg/kg hasta un máximo de 444 horas a una dosis de 10,0 mg/kg. La vida media de eliminación terminal ($t_{1/2z}$) estimada de forma no compartimental es de 31 horas en todos los grupos de dosis IV. Se ha descubierto que la eliminación (CL, CL/F) de αOPGL-1 no es lineal, con los animales que reciben dosis IV de 10 mg/kg con una eliminación media (0,120 ml/hr/kg) que es 3,3 veces inferior a la de los que reciben 0,1 mg/kg (0,401 ml/hr/kg).

Tras la administración subcutánea, la absorción es lenta, con concentraciones máximas (C_{máx}) medias de 11.600 ng/ml a 132 horas. Existe una gran variabilidad en el rango de exposición tras la administración SC, resultante en una

eliminación media de $0,387 \pm 0,281$ ml/hr/kg y un tiempo de residencia medio de $202 \pm 80,1$ horas. La biodisponibilidad media es de 89%.

Los datos precedentes se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros farmacocinéticos no compartimentales medios (\pm SD)³ en monos cangrejas tras la administración de una única dosis de α OPGL-1 IV y SC

Cálculos del parámetro no compartimental						
Parámetro	Unidad	1,0 mg/kg		0,1 mg/kg	1,0 mg/kg	10 mg/kg
		SC (n=6)		IV (n=2)	IV(n*2)	IV (n=2)
		Medio	SD	Medio	Medio	Medio
T _{máx}	hora	132	60,2	0	0	0
C _{máx}	ng/ml	11600	3410	4330	38200	326000
	hora	34,9	11,1	30,7	31,4	ND ^b
AUC (0- ∞)	μ g*hr/ml	3520	1750	253	3950	99900
CL, CL/F	ml/hr/kg	0,387	0,281	0,401	0,256	0,120
MRT	hora	202	80,1	84,8	124	519
V _{ss}	ml/kg	N/A ^c	N/A	33,7	31,7	55,9

^aSe recogen los valores de 3 cifras importantes.
^bMuestras PK resistentes a la fase de estancamiento (p) no determinadas por lo que no se ha observado la fase terminal.
^cNo aplicable.

α OPGL-1 causa un descenso rápido de los niveles séricos de N-Tx en las 24 horas siguientes a la dosis (Figura 14). El tiempo medio de efecto máximo se observa entre las 12 horas y los 7 días siguientes a la dosis, dado que las dosis IV aumentan de 0,1 a 10 mg/kg, y entre 12 horas y 11 días en los animales que reciben una dosis SB de 1,0 mg/kg. El efecto máximo aumenta con la dosis de aproximadamente 80 a 91 % sobre un rango de dosis de 0,1 a 1 mg/kg. No obstante, a dosis mayores no se observa una mayor supresión con una inhibición máxima del 91%. Los niveles medios de N-Tx sérico regresan a la línea de base para el día 28 después de la administración de 0,1 mg/kg IV y para el día 70 tras la administración de 1 mg/kg SC. N-Tx en la orina muestra tendencias similares al N-Tx sérico, salvo porque todos los grupos regresan a los valores de la línea de base para el día 105 del estudio (Figura 15).

La supresión de Ca sérico aumenta con la dosis hasta un nadir medio de 31,6% por debajo de la media de la línea de base, siete días después de la administración IV de 10,0 mg/kg. Todos los demás grupos de dosis registran descensos medios de Ca sérico inferiores al 26,4% con respecto a las medias de la línea de base. Para el día 17 todos los niveles de Ca sérico en los animales tratados regresaron al rango del 10% de las medias de su línea de base (Figura 20).

Dado que la reabsorción y la formación óseas están íntimamente ligadas a los cambios en los marcadores de la formación de hueso (ALP) también se observan con un descenso mucho menor de los niveles de ALP y una supresión más prolongada que el marcador de formación, N-Tx (Figura 21). Observando el descenso de los marcadores de reabsorción ósea antes que los marcadores de formación de hueso (ALP) tras la dosis de OPGL-1 se confirma que el α OPGL-1 es un agente anti-reabsorción del hueso.

La mayoría de los animales (9 de 12) desarrollan anticuerpos de α OPGL-1. La incidencia de los anticuerpos de α OPGL-1 no depende de la dosis ni de la vía. No es posible evaluar el efecto de los anticuerpos de α OPGL-1 sobre la farmacocinética de α OPGL-1 por encima de 0,1 mg/kg cuando ningún grupo de dosis tiene animales de anticuerpo tanto negativo como positivo. A 0,1 mg/kg IV, la mayor parte de α OPGL-1 se elimina antes del desarrollo del anticuerpo y, por lo tanto, los efectos sobre la disposición de α OPGL-1 no se observan (Figura 16).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boyle, William J
 Martín, Francis H
 Corvalan, Jose R
 Davis, C. Geoffrey

<120> Anticuerpos de OPGL

<130> 06843.0049-00000

<150> 60/301.172

<151> 26-06-2001

ES 2 342 820 T5

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1426

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

```

aagcttgacc accatggagt ttgggtgag ctggcttttt. cttgtggcta ttttaaaagg      60
tgtccagtgt gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctgggggggtc      120
cctgagactc tctgtgcag cctctggatt cacctttage agctatgcc a tgagctgggt      180
ccgccaggct ccaggaagg ggctggagtg ggtotcaggt attactggga gtggtggtag      240
tacatactac gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa      300
cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc      360

gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttggttcgac ccctggggcc agggaaccct      420
ggtcaccgtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg cgcctgtctc      480
caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga      540
accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca cettcccagc      600
tgtcctacag tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa      660
cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga      720
caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgccaccg tgcccagcac cacctgtggc      780
aggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac      840
ccctgaggtc acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccagg tccagttcaa      900
ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt      960
caacagcaag ttcctgtgtg tcaegctcct caccgttgtg caccaggact ggtgaaacgg      1020
caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcca gcccccacg agaaaaccat      1080
ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga      1140
ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcttggtc aaaggcttct accccagcga      1200
catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc      1260
catgctggac tccagcggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag      1320
gtggcagcag gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccaacta      1380
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgataa gtcgac      1426

```

<210> 2

<211> 467

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

5

10

ES 2 342 820 T5

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe
 115 120 125

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
 210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
 225 230 235 240

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
 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

ES 2 342 820 T5

275		280		285											
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	290					295					300				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe
305					310					315					320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				325					330					335	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			340					345					350		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	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	
Met	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> 3
 <211> 728
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 3

5

ES 2 342 820 T5

```

tctagaccac catggaacc ccagcgcagc ttctcttct cctgctactc tggctcccag      60
ataccaccgg agaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg     120
aaagagccac cctctcctgt agggccagtc agagtgttcg cggcaggtac ttagcctggt     180
accagcagaa acctggccag gctcccagge tctcatcta tggtgcatcc agcagggcca     240
ctggcatccc agacaggttc agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctccatca      300
gcagactgga gcctgaagat tttgcagtgt tttactgtca gcagtatggt agttcacctc     360
ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccactgtct     420
tcactctccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgccctctgtt gtgtgcctgc     480
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat     540
cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca     600
gcagcacctt gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag     660
tcacccatca gggcctgagc togcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttgat     720
aagtcgac                                     728
    
```

<210> 4
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

```

<400> 4
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1          5          10          15

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

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35          40          45

Val Arg Gly Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
          50          55          60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
    
```


<220>
 <223> Cebador 5' anti-OPGL-1 kappa

 <400> 7
 caactctaga ccacatgga aaccccagcg 30
 5 <210> 8
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 3' anti-OPGL-1 kappa

 <400> 8
 ttgacgtcg acttatcaac actctcccct gttgaag 37
 10 <210> 9
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 5' IgG2 RACE

 <400> 9
 ggcacgtca ccacgtgct gag 23
 15 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 3' IgG2 RACE

 <400> 10
 cctccaccaa gggcccatcg gtct 24
 20 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 5' anti-OPGL-1 IgG2

 <400> 11
 cagaagcttg accacatgg agttgggct gagctggctt ttctgtgg c 51
 25 <210> 12
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador 3' anti-OPGL-1 IgG2

 <400> 12
 gcatgtgac ttatcattta cccggagaca gggagag 37
 30 <210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 13

ES 2 342 820 T5

Glu Val Gln Leu Leu 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
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 14
 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 Arg Gly Arg
 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 Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador aleatorio
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(23)
 5 <223> N es A, C, G, o T

 <400> 15
 ggccggatag gcctcacnnn nnnt 24

 <210> 16
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> traducción de la porción del cebador 5' anti-OPGL-1 kappa
 15 <400> 16

Met Glu Thr Pro Ala
1 5

 <210> 17
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> traducción de la porción del cebador 3' anti-OPGL-1 kappa
 <400> 17

Cys Glu Gly Arg Asn Phe
1 5

 25 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> traducción de la porción del cebador 5' anti-OPGL-1 IgG2
 <400> 18

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala
1 5 10

 35 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> traducción de la porción del cebador 3' anti-OPGL-1 IgG2
 <400> 19

Lys Gly Pro Ser Leu Ser Leu
1 5

 45 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido antagonista de LHRH

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Ac-D-Nal, donde Nal es 3-(2-naftil)alaninil

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es (4'-clorofenil)alaninil

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es D-Pal, donde Pal es 3-(3'-piridil)alaninil

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5')

<223> Xaa es N-metil tirosina

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(B)

<223> Xaa es N-épsilon-2-propil-lisinil

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es D-alanina-NH2

<400> 20

Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Pro Xaa
1 5 10

35

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde:
la cadena pesada comprende:
una secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13; y
5 la cadena ligera comprende:
una secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14; y donde el anticuerpo se une a un ligando de osteoprotegerina (OPGL) e inhibe la unión del OPGL a un receptor de diferenciación y activación de osteoclasto (ODAR).
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la cadena pesada y la cadena ligera están conectadas mediante un enlace flexible para formar un anticuerpo de cadena simple.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, que es un anticuerpo Fv de cadena simple.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo Fab.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo Fab'.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo (Fab')₂.
- 15 7. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es totalmente humano.
8. Un anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 del residuo 20 al residuo 467, y donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 del residuo 21 al residuo 235.
- 20 9. Un anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 del residuo 20 al residuo 467, y donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 del residuo 21 al residuo 235.
10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

FIGURA 1

cDNA de cadena pesada del α OPGL-1

Secuencia de DNA del plásmido de expresión que comienza en el sitio HindIII, hasta el sitio Sall. El codón de comienzo empieza en nt 14, el codón de terminación empieza en nt 1415.

```

1  AAGCTTGACC ACCATGGAGT TTGGGCTGAG CTGGCTTTTT CTTGTGGCTA TTTTAAAAGG
61  TGTCAGTGT GAGGTGCAGC TGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGTACAGC CTGGGGGGTC
121 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT
181 CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTACTGGGA GTGGTGGTAG
241 TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA
301 CACGCTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC
361 GAAAGATCCA GGGACTACGG TGATTATGAG TTGGTTTCGAC CCCTGGGGCC AGGGAACCTT
421 GGTCACCGTC TCCTCAGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG CGCCCTGCTC
481 CAGGAGCACC TCCGAGAGCA CAGCGGCCCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA
541 ACCGGTGACG GTGTCTGGA ACTCAGGCGC TCTGACCAGC GGCCTGCACA CCTTCCAGC
601 TGTCTACAG TCCTCAGGAC TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCTCCAGCAA
661 CTTCGGCACC CAGACCTACA CCTGCAACGT AGATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA
721 CAAGACAGTT GAGCGCAAAT GTTGTGTCGA GTGCCACCG TGCCAGCAC CACCTGTGGC
781 AGGACCGTCA GTCTTCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCGGAC
841 CCCTGAGGTC ACGTGCCTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA
901 CTGGTACGTG GACGGCTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCACGGG AGGAGCAGTT
961 CAACAGCACG TTCCGTGTGG TCAGCGTCT CACCGTTGTG CACCAGGACT GGCTGAACGG
1021 CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCA GCCCCATCG AGAAAACCAT
1081 CTCAAACC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCCGGA
1141 GGAGATGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ACCCCAGCGA
1201 CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACACCTCC
1261 CATGCTGGAC TCCGACGGCT CTTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG
1321 GTGGCAGCAG GGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
1381 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGATAA GTCGAC (SEQ ID NO: 1)

```

FIGURA 2

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada del α OPGL-1

El péptido señal de IgG2 está subrayado, la región variable está en mayúsculas y no está subrayada, y la región constante está en minúsculas.

1 MEFGLSWLFL VAILKGVQCE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
 61 GKGLEWVSGI TGGGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
 121 TTVIMSWFDP WQQGTLVTVS Sastkgpsvf plapcsrsts estaalgciv kdyfpepvtv
 181 swnsgaltsg vhtfpaviqs sglyslssvv tvpssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdkve
 241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwyvd
 301 gvevhnaktk preeqfnstf rvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnkglpa piektisktk
 361 gqprepvyt lppsreemtk nqvsitclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmlds
 421 dgsfflyskl tvdkrwwqg nvfscsvmhe alnhhtqks lsispk (SEQ ID NO: 2)

FIGURA 3

cDNA de cadena ligera kappa del α OPGL-1 .

Secuencia de DNA de la secuencia del plásmido de expresión de la cadena kappa desde el sitio XbaI hasta el sitio SalI. El codón de comienzo empieza en nt 12; el codón de terminación empieza en nt 717

```

1  TCTAGACCAC CATGGAAACC CCAGCGCAGC TTCTCTTCTT CCTGCTACTC TGGCTCCCAG
61 ATACCACCGG AGAAATTGTG TTGACGCAGT CTCCAGGCAC CCTGTCTTTG TCTCCAGGGG
121 AAAGAGCCAC CCTCTCCTGT AGGGCCAGTC AGAGTGTTTCG CGGCAGGTAC TTAGCCTGGT
181 ACCAGCAGAA ACCTGGCCAG GCTCCCAGGC TCCTCATCTA TGGTGATCC AGCAGGGCCA
241 CTGGCATCCC AGACAGGTTT AGTGGCAGTG GGTCTGGGAC AGACTTCACT CTCACCATCA
301 GCAGACTGGA GCCTGAAGAT TTTGCAAGT TTTACTGTCA GCAGTATGGT AGTTCACCTC
361 GGACGTTTCG CCAAGGGACC AAGGTGGAAA TCAAACGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT
421 TCATCTTCCC GCCATCTGAT GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCTCTGTT GTGTGCCTGC
481 TGAATAACTT CTATCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT
541 CGGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC TACAGCCTCA
601 GCAGCACCTT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACGAGAAACA CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG
661 TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTGAT
721 AAGTCGAC (SEQ ID NO: 3)

```

FIGURA 4

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa del α OPGL-1

El péptido señal kappa está subrayado, la región variable está en mayúsculas y no está subrayada, y la región constante está en minúsculas

1 METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR
51 GRYLAWYQOK PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
101 PEDFAVFYQC QYGSSPRTFG QGTKVEIKrt vaapsvfifp psdeqlksgt
151 asvvcllnnf ypreakvqwk vdnalqsgns qesvteqdsd dstyslsstl
201 tlskadyekh kvyacevthq glsspvtksf nrged (SEQ ID NO: 4)

FIGURA 5

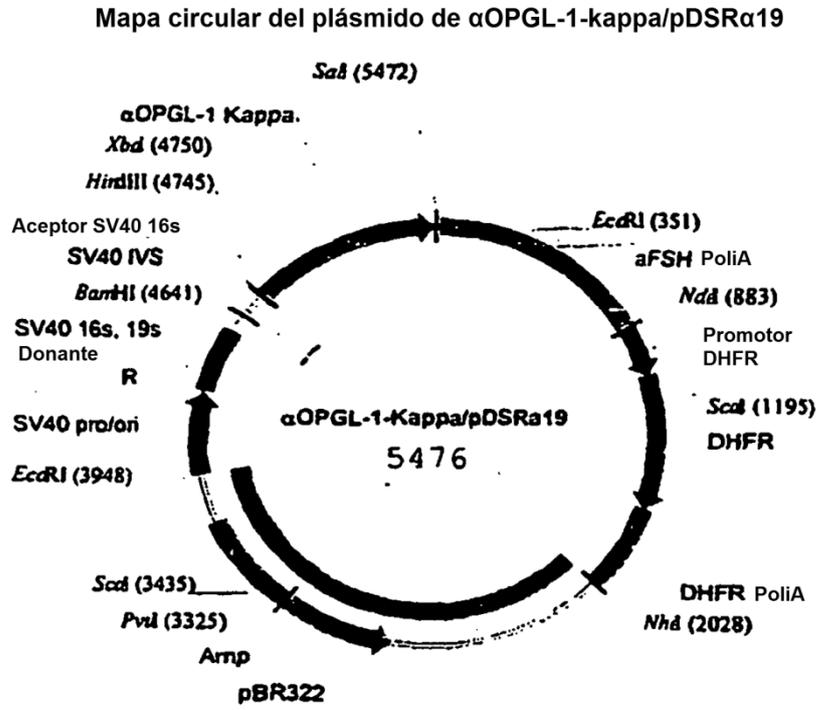


FIGURA 6

Mapa circular del plásmido de α OPGL-1-IgG2/pDSRa19

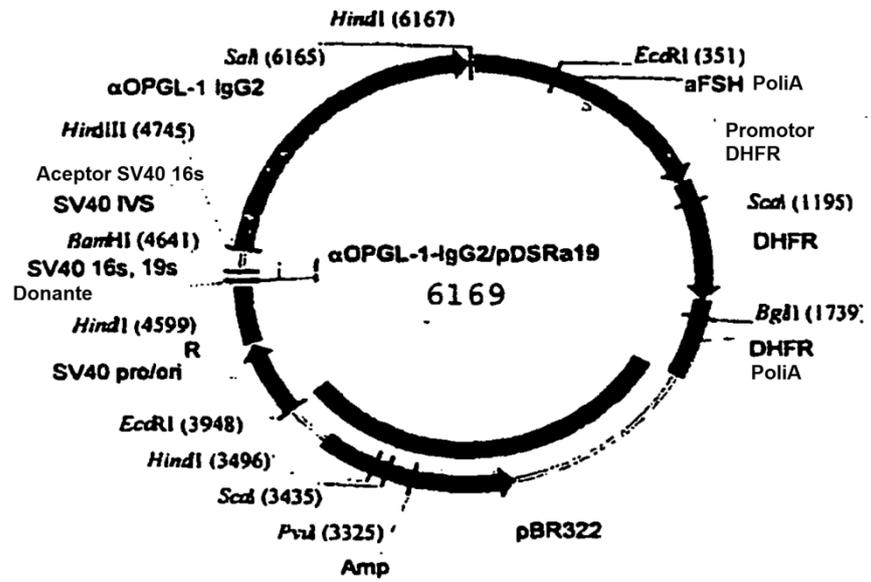
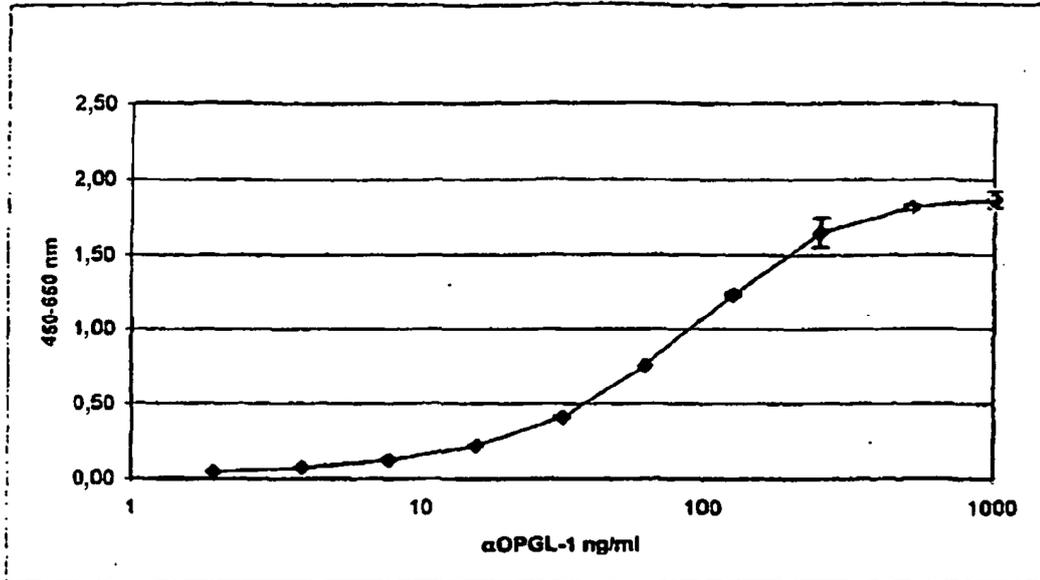


FIGURA 7

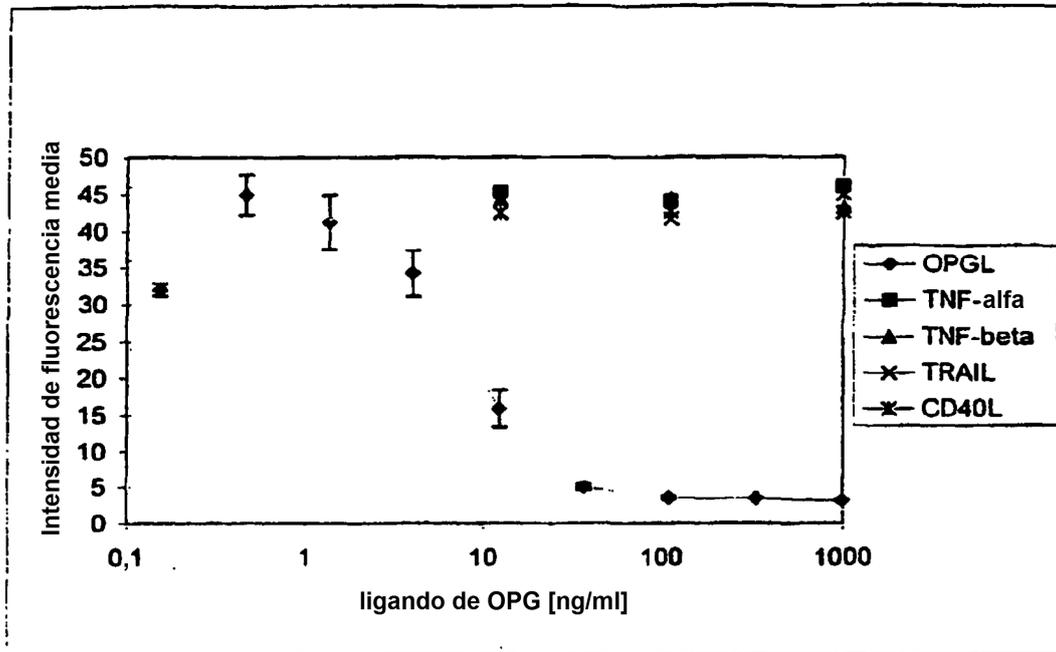
α OPGL-1 se une al ligando de OPG soluble revestido en la placa EIA de forma dependiente de la dosis



Las placas EIA de 96 pocillos están revestidas con OPLG soluble recombinante. Se añaden concentraciones variables de α OPGL-1 a los pocillos y se incuba durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detecta con IgG de cabra anti-humana (Fab')-Peroxidasa de rábano picante. La absorbancia se lee a 450 nm y 650 nm.

FIGURA 8

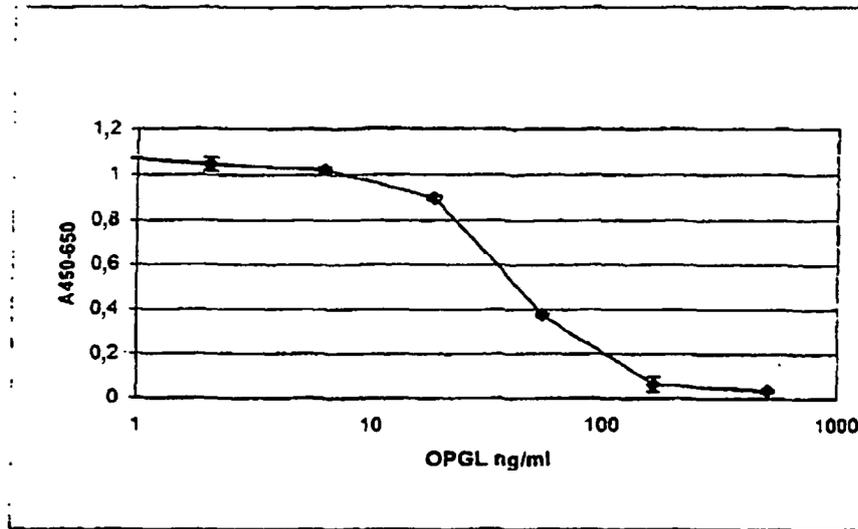
α OPGL-1 se une específicamente al OPGL unido a la membrana



α OPGL-1 se une a OPGL expresado en una superficie celular de células CHO REN 218-9 células de una forma dependiente de la dosis. La unión se completa mediante la adición exógena de OPGL humano pero no mediante ligando de TNF- α , TNF- β o CD40. α OPGL-1 (100 ng/ml) se preincuba con concentraciones variables de OPGL soluble u otros ligandos y después se incuba con células CHO REN 218-9 que expresan OPGL en la superficie. Las células se incuban después a 30 minutos a 2-8 °C con F(ab') marcado con FITC en cabra de anti-IgG humana, específico de fragmento Fc γ . Después de la centrifugación y el lavado se mide la fluorescencia de la superficie celular usando citometría de flujo.

FIGURA 9

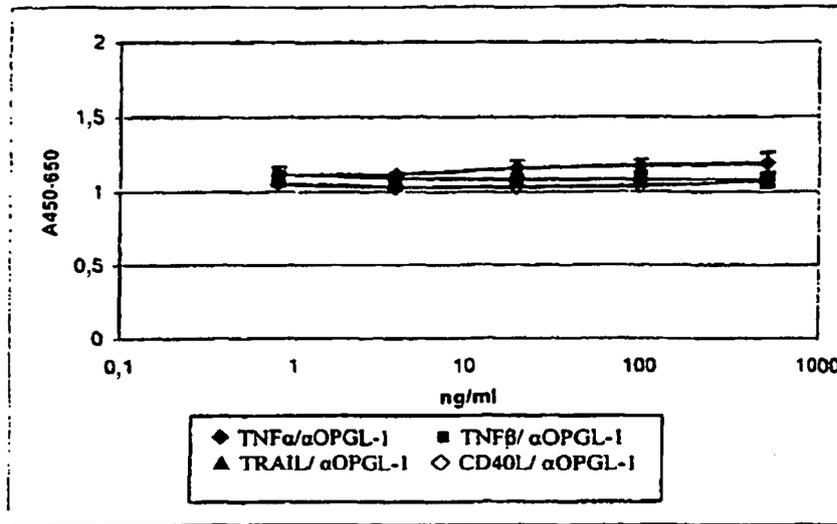
α OPGL-1 se une a OPGL soluble



La unión de α OPGL-1 a OPGL en una placa EIA se reduce competitivamente mediante OPGL soluble añadido exógenamente

Figura 10

α OPGL-1 no se une a los miembros de la familia TNF: ligando de TNF α , TNF β , TRAIL o CD40



La unión de α OPGL-1 a OPGL en una placa EIA no se reduce mediante el ligando de TNF- α , TNF- β , TRAIL o CD40 añadido exógenamente

FIGURA 11

Inhibición dependiente de la dosis mediante α OPGL-1 de la actividad TRAP inducida por el ligando de OPG en las células RAW 264.7

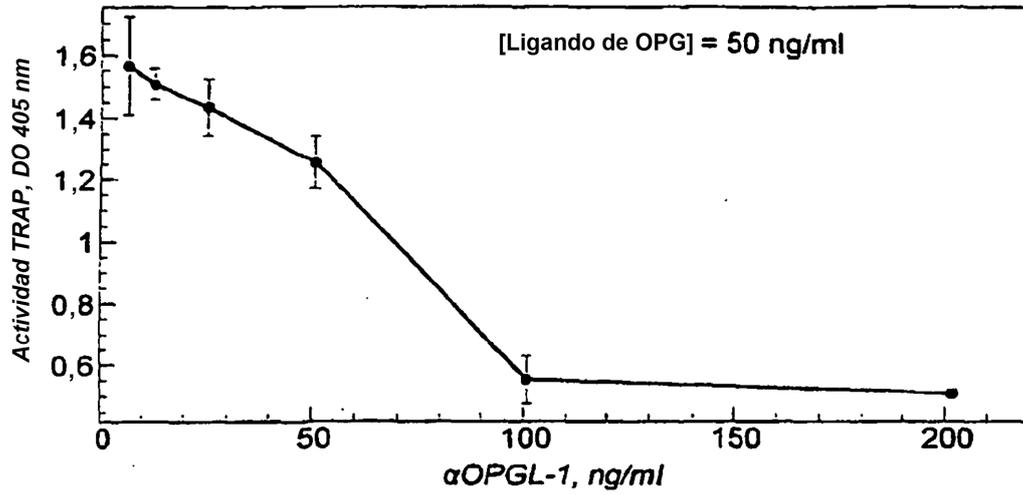


FIGURA 12

Inhibición dependiente de la dosis por α OPGL-1 de la unión del ligando de OPG marcado con europio a ODAR-FLAG/anti-FLAG-APC

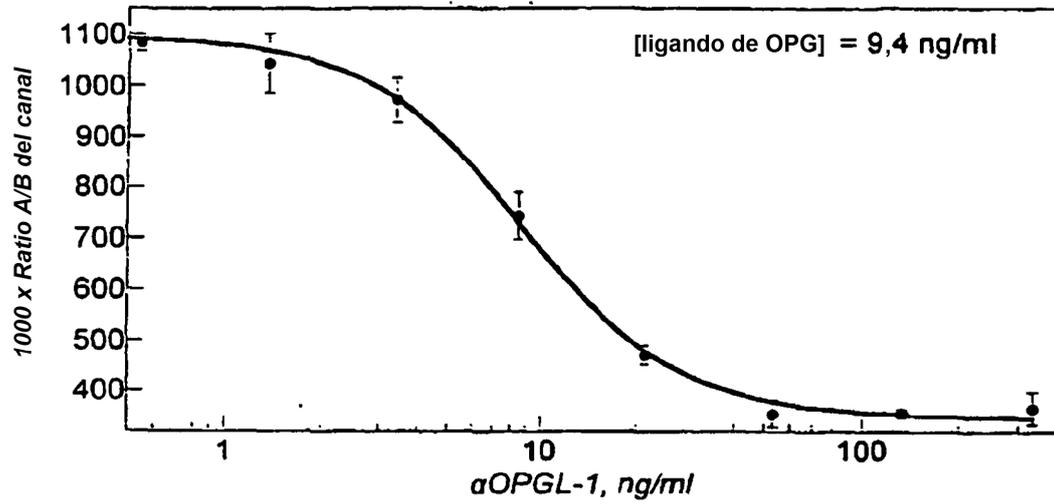


FIGURA 13

Perfiles de media (\pm DT) de concentración sérica-tiempo tras la administración de la dosis única de α OPGL-1 a monos cangrejeros a dosis de 0,1, 1 y 10,0 mg/kg IV (n=2/dosis) y 1,0 mg/kg SC (n=6/dosis)

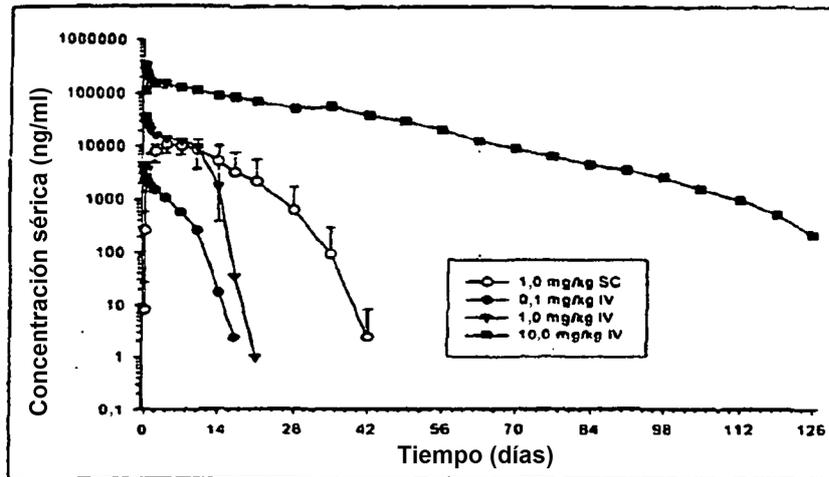


FIGURA 14

Cambio porcentual medio (\pm DT) en la concentración sérica de N-Tx tras la administración de una dosis única de α OPGL-1 IV (n=2/dosis) o SC (n=6) a monos cangrejeros a dosis de 0,1, 1 y 10,0 mg/kg.

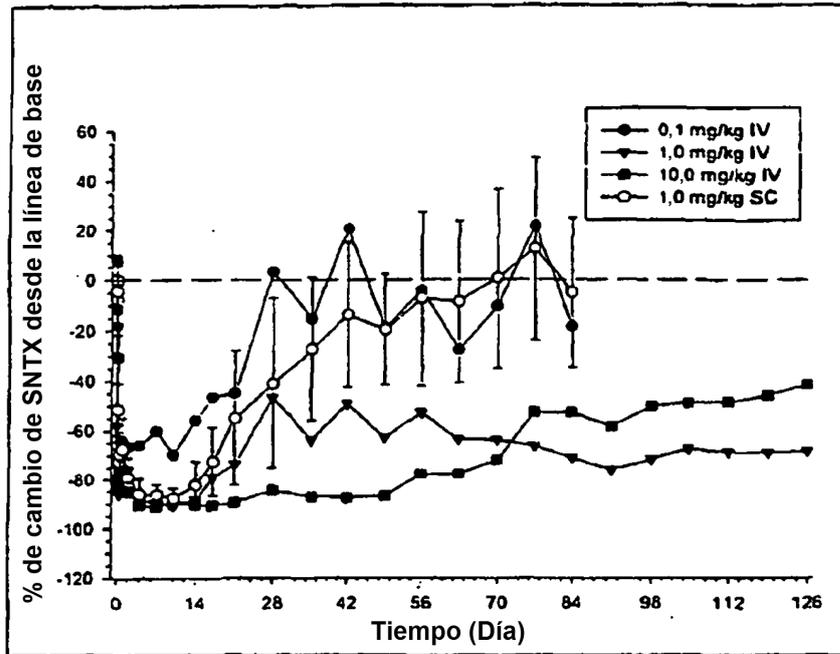


FIGURA 15

Cambio porcentual medio (\pm DT) en la concentración en orina de N-Tx tras la administración de una dosis única de α OPGL-1 IV (n=2/dosis) o SC (n=6) a monos cangrejeros a dosis de 0,1, 1 y 10,0 mg/kg.

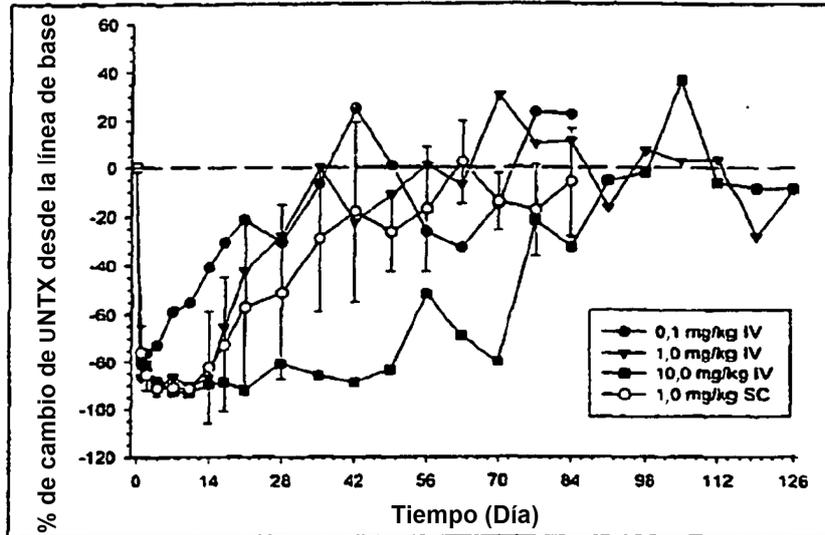


FIGURA 16

Perfiles de concentración sérica-tiempo en animales con anticuerpo positivo (símbolos negros abiertos) y negativo (símbolos rojos cerrados) tras la administración de una dosis única IV de α OPGL-1 a monos cangrejeros a una dosis de 0,1 mg/kg

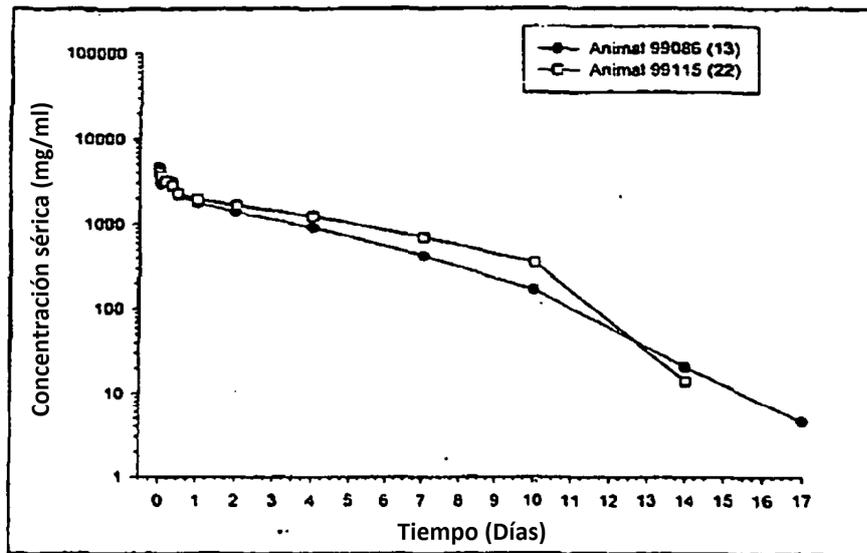


FIGURA 17

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de α OPGL-1

**1 EVQLLES GGG LVQ PGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWRQA
41 PGKGLEWVSG ITGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
81 LQMNSLRAED TAVYYCAKDP GTTVIMSWFD PWGQGLVTV
121 SS (SEQ ID NO: 13)**

FIGURA 18

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de α OPGL-1

1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR GRYLAWYQQK
41 PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE
81 PEDFAVFCYQ QYGSSPRTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)

FIGURA 19

Diagrama de flujo del procedimiento de cultivo celular

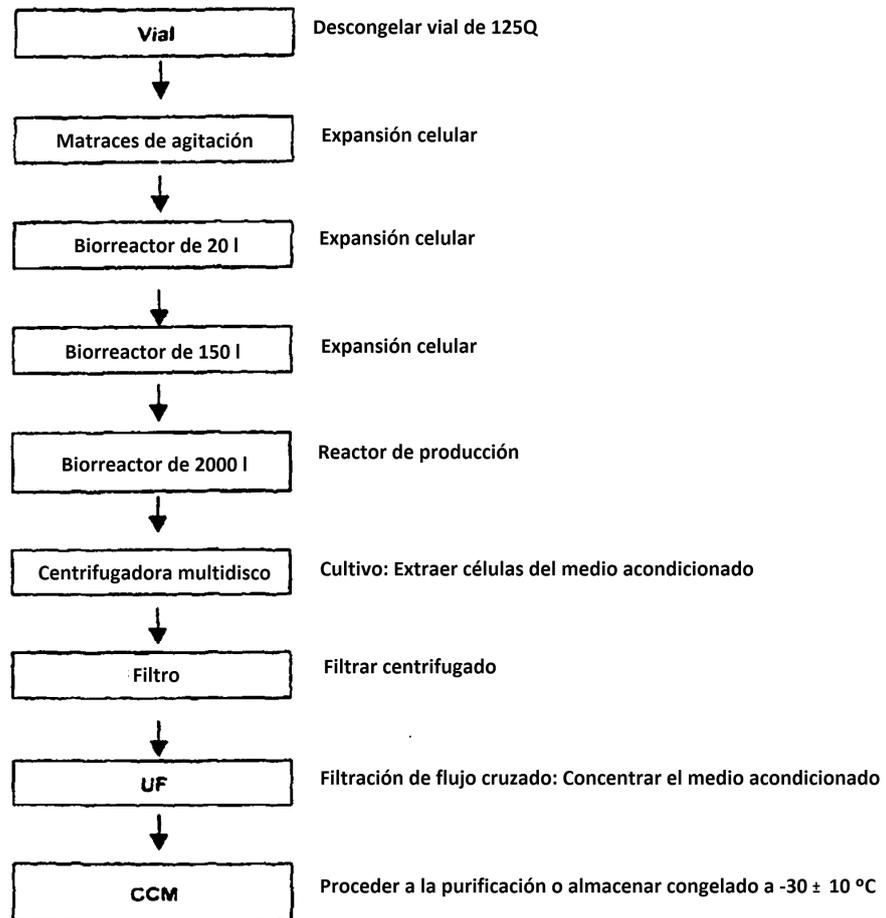


FIGURA 20

Porcentaje medio de cambio de calcio sérico desde la línea de base después de administrar una única dosis de α OPGL-1 a monos cangrejeros

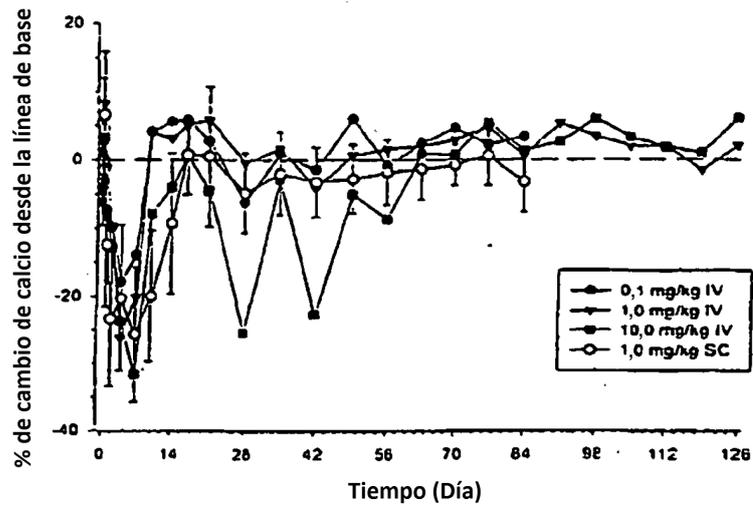


FIGURA 21

Porcentaje medio de cambio de fosfatasa alcalina sérica desde la línea de base después de administrar una única dosis de α OPGL-1 a monos cangrejeros

