



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 368 101**

⑯ Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑯ Número de solicitud europea: **08015570 .8**
⑯ Fecha de presentación: **13.05.1999**
⑯ Número de publicación de la solicitud: **2009025**
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

⑭

Título: **PROCEDIMIENTO PARA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS OSTEOCLASTOS.**

⑯

Prioridad:
14.05.1998 US 85487 P
03.12.1998 US 110836 P

⑯

Titular/es:
IMMUNEX CORPORATION
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320, US

⑯

Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.11.2011

⑯

Inventor/es:
Anderson, Dirk M. y
Galibert, Laurent J.

⑯

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.11.2011

⑯

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 101 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para inhibición de la actividad de los osteoclastos

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere general al campo de los receptores de las citocinas, y de manera más específica, a las parejas receptor/ligando de citocinas que tienen actividad reguladora de los osteoclastos. La invención pertenece a la actividad de un anticuerpo que se une a un polipéptido rankl y antagoniza la reacción de rank y rankl.

Antecedentes de la invención

RANK (Activador del receptor de NF- κ B) y su ligando (RANKL) son una pareja receptor/ligando recientemente descrita que juega un importante papel en una respuesta inmune. En los documentos US 6017729 y US 6242213 se describe la clonación de RANK y RANKL respectivamente. Se ha encontrado recientemente que RANKL contiene una proteína denominada como osteoprotegerina (OPG), un miembro de la familia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR). Yasuda y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. 95:3597; 1998) por ejemplo clonaron la expresión de un ligando de OPG, que se denominó como factor inhibidor de la osteoclastogénesis. Lacey y col. (Cell 93:165; 1998) repitieron su trabajo. En ambos casos, el ligando que clonaron resultó ser idéntico a RANKL.

El documento de Simonet y col., Cell, vol.89, pp.309-319 describe la clonación y la caracterización de la osteoprotegerina (OPG).

El documento de Anderson y col., Nature, vol.390, pp.175-179 describe el uso de una fusión entre una IgFc y el dominio extracelular de RANK para identificar el Ligando de RANK (RANKL).

El documento de Read R, J. Antimicrob. Chemother., vol. 41, Suppl. A, pp.65-69 descubre TNFR y anticuerpos contra TNF solubles como antagonistas de TNF.

En la osteoclastogénesis, la interacción de un osteoblasto o célula estromal con un precursor osteoclástico conduce a la diferenciación del precursor en un osteoclasto. Se sabe que la OPG inhibe esta diferenciación. Se ha propuesto un modelo en el que RANKL en el osteoblasto o en la superficie de la célula estromal interactúa con un receptor específico sobre una superficie del osteoclasto progenitor, señalizando un episodio de diferenciación. OPG bloquea eficazmente la interacción de RANKL con un receptor sobre los osteoclastos progenitores *in vitro*, y se ha demostrado que mejora los efectos de la ovariectomía sobre la pérdida ósea en ratones. Sin embargo. Se sabe también que la OPG se une a otros ligandos de la familia TNF, lo que puede tener un efecto perjudicial sobre las actividades de dichos ligandos *in vivo*. Además, la presencia de otros ligandos que se unen a la OPG *in vivo* puede requerir elevadas dosificaciones de la OPG que se va a administrar con el fin de tener suficiente OPG soluble disponible para inhibir la osteoclastogénesis.

De acuerdo con esto, existe una necesidad en la técnica de identificar factores solubles que se unan específicamente a RANKL e inhiban la capacidad de RANKL para inducir la osteoclastogénesis sin reaccionar con otros ligandos.

Resumen de la invención

La invención en su sentido más amplio es tal como se define en las reivindicaciones independientes.

Las formas de realización preferidas son como se enumeran en las reivindicaciones dependientes.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona procedimientos asociados con el uso de un receptor novedoso, denominado como RANK (por activador del receptor de NF- κ B), que es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. RANK es una proteína transmembrana de Tipo I que tiene 616 restos de aminoácidos, que comprende un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio citoplásico. RANKS interactúa con diversos Factores Asociados al Receptor de TNF (TRAF); que estimulan los resultados de RANK en la regulación en exceso del factor de transcripción NF- κ B, un factor de transcripción ubicuo que se utiliza lo más extensamente en células del sistema inmune.

Se pueden preparar formas solubles del receptor y usarse para interferir con la transducción de la señal a través de RANK unido a membrana. La inhibición de la transducción de la señal medida por RANKL será útil para mejorar los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica en estados de enfermedad en los que existen demasiadas roturas de huesos. Entre los ejemplos de dichas dolencias se incluyen osteoporosis, enfermedad de Paget, cánceres que pueden metastatizar el hueso e inducir roturas de huesos (es decir, mieloma múltiple, cáncer de mama, algunos melanomas, véase también Mundy, C. Cancer Suppl. 80: 1546; 1997), y cánceres que no metastatizan necesariamente el hueso, pero dan como resultado una hipercalcemia y la pérdida de hueso (por ejemplo, carcinoma de células escamosas).

Las formas solubles de RANK comprenden el dominio extracelular de RANK o uno de sus fragmentos que se une a

RANKL. Se pueden preparar proteínas de fusión de RANK para facilitar la preparación de RANK soluble. Entre los ejemplos de dichas proteínas de fusión se incluyen una proteína de fusión RANK/Fc, una proteína de fusión de un resto en cremallera (es decir, una cremallera de leucina), y diversas etiquetas que son conocidas en la materia. Se dan a conocer también en la invención otros antagonistas de la interacción de RANK y RANKL (es decir, anticuerpos dirigidos contra RANKL, moléculas pequeñas), tal como se define en las reivindicaciones. Estos y otros aspectos de la presente invención llegarán a ser evidentes tras referencia a la siguiente descripción detallada de la invención.

5 Se identificó una inserción de ADNc parcial novedosa con un marco de lectura abierto previsto que tiene alguna similitud con CD40 y se usó para hibridar las manchas de colonias generadas a partir de una biblioteca de ADNc de una célula dendrítica (CD) que contenía los ADNc de longitud completa. La SEQ ID NO: 1 muestra los nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de una proteína de longitud completa prevista.

10 RANK es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF; se asemeja mucho a CD40 en la región extracelular. RANK se expresa en las células epiteliales, algunas líneas de linfocitos B, y en linfocitos T activados. Sin embargo, su expresión en linfocitos T activados es tardía, aproximadamente cuatro días después de la activación. Este curso temporal de la expresión coincide con la expresión de Fas, un conocido agente de la apoptosis. RANK puede actuar como una señal antiapoptótica, rescatando células que expresan RANK de la apoptosis tal como se sabe que hace CD40. Alternativamente, RANK puede confirmar una señal apoptótica en las circunstancias apropiadas, de nuevo, de manera similar a CD40. Es probable que RANK y su ligando jueguen un papel integral en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Se describe el aislamiento de un ADN que codifica RANK en el documento US 6017729. El documento US 15 6017729 describe algunas formas de RANK.

20 RANK soluble comprende el péptido señal y el dominio extracelular (restos 1 a 213 de la SEQ ID NO: 2) o uno de sus fragmentos. Alternativamente se puede sustituir un péptido señal diferente por el líder nativo, comenzando con el resto 1 y continuando a través de un resto seleccionado entre el grupo constituido por los aminoácidos 24 a 33 (inclusive) de la SEQ ID NO: 2. Además, los fragmentos del dominio extracelular proporcionarán también formas solubles de RANK.

25 25 Se pueden preparar los fragmentos usando técnicas conocidas para aislar una porción deseada de la región extracelular, y se pueden preparar, por ejemplo, comparando la región extracelular con las de otros miembros de la familia de TNFR (de la cual RANK es un miembro) y seleccionando las formas similares a las preparadas para otros miembros de la familia. Alternativamente, se pueden usar sitios de restricción únicos o técnicas de la PCR que se conocen en la materia para preparar numerosas formas truncadas que se pueden expresar y analizar para la actividad.

30 35 Otros derivados de las proteínas RANK incluyen conjugados covalentes o agregativos de las proteínas o de sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante síntesis en cultivo recombinante como fusiones N terminales o C terminales. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser una secuencia polipeptídica señal (o líder) en la región N terminal de la proteína que dirige de manera traduccionalmente simultánea o después de la traducción la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis a su sitio de función en el interior o en el exterior de la membrana o de la pared celular (por ejemplo, el factor α líder de levadura).

40 La proteínas de fusión pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o la identificación de las proteínas RANK y los homólogos (por ejemplo, poli-His). Se puede unir también la secuencia de aminoácidos de la proteína a un péptido de identificación tal como el descrito por Hopp y col., BiolTechnology 6: 1204 (1988; FLAG™). Dicho péptido muy antigénico proporciona un epítopo unido de manera reversible mediante un anticuerpo monoclonal específico, permitiendo una rápida prueba y una fácil purificación de la proteína recombinante expresada. La secuencia de Hopp y col. se escinde también específicamente mediante la enterocinasa mucosal bovina, facilitando la eliminación del péptido procedente de la proteína purificada.

45 50 Las proteínas de fusión comprenden además la secuencia de aminoácidos de RANK unida a una región Fc de la inmunoglobulina. Una región Fc a modo de ejemplo es una IgG humana, que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. Se pueden usar también fragmentos de una región Fc, como pueden ser las mutaciones de Fc. Por ejemplo, algunos restos en el interior de la región bisagra de una región Fc son críticos para disponer de una elevada afinidad de unión con FcγRI. Canfield y Morrison (J. Exp. Med. 173: 1483; 1991) informaron que Leu₍₂₃₄₎ y Leu₍₂₃₅₎ fueron críticos para la elevada afinidad de unión de IgG₃ con FcγRI presente en células U937. Lund y col. (J. Immunol. 147: 2657, 1991; Molecular Immunol. 29: 53, 1991) obtuvieron similares resultados. Se pueden realizar dichas mutaciones, solas o en combinación en una región Fc de IgG, para disminuir la afinidad de IgG₁ por FcR. Dependiendo de la porción de la región Fc usada, se puede expresar una proteína de fusión como un dímero, mediante la formación de enlaces disulfuro intercadena. Si se preparar las proteínas de fusión con las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, es posible formar un oligómero de proteína con como mucho cuatro regiones RANK.

En otro aspecto, las proteínas RANK comprenden además un péptido de oligomerización tal como un dominio en cremallera. Se identificaron originalmente cremalleras de leucina en algunas proteínas de unión al ADN (Landschulz y col., *Science* 240: 1759, 1988). El dominio en cremallera es un término usado para referirse a un dominio peptídico conservado presente en estas proteínas (y en otras), que es responsable de la multimerización de las proteínas. El dominio en cremallera comprende una repetición en héptada repetitiva, con cuatro o cinco restos de leucina, isoleucina o valina intercalados con otros aminoácidos. Los ejemplos de dominios en cremallera son los que se encuentran en el factor GCN4 de transcripción de levadura y en una proteína de unión al ADN térmicamente estable que se encuentra en el hígado de rata (C/EBP; Landschulz y col., *Science* 243: 1681, 1989). Dos proteínas transformantes nucleares *fos* y *jun*, presentan también dominios en cremallera, como lo hace el producto génico del protooncogen de murino, *c-myc* (Landschulz y col., *Science* 240: 1759, 1988). Los productos de los oncogenes nucleares *fos* y *jun* comprenden dominios en cremallera que forman preferentemente un heterodímero (O'Shea y col., *Science* 245: 646, 1989; Turner y Tjian, *Science* 243: 1689, 1989). Un resto en cremallera preferido es el de SEQ ID NO: 6 o uno de sus fragmentos. Se dan a conocer este y otros restos en cremallera en la Patente de los Estados Unidos 5.716.805.

Otras proteínas útiles incluyen los polipéptidos RANK codificados por ADN capaces de hibridarse con el ADN de SEQ ID NO: 1 en condiciones moderadamente rigurosas (disolución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y en condiciones de hibridación de 50°C, 5 X SSC, durante la noche) con las secuencias de ADN que codifican RANK, o más preferiblemente en condiciones rigurosas (por ejemplo, hibridación en 6 X SSC a 63°C durante la noche; lavado en 3 X SSC a 55°C) y otras secuencias que están degeneradas con las que codifican RANK. En un aspecto los polipéptidos RANK son al menos aproximadamente un 70% idénticos en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de la proteína RANK natural tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 para RANK humano y en la NO: 6 para RANK de murino. En otro aspecto, los polipéptidos RANK son al menos aproximadamente un 80% idénticos en la secuencia de aminoácidos a la forma natural de RANK; los polipéptidos más preferidos son los que son al menos aproximadamente un 90% idénticos a RANK natural.

Se puede determinar el porcentaje de identidad usando un programa informático, por ejemplo, el programa informático GAP descrito por Devereux y col. (*Nucl. Acids Res.* 12: 387, 1984) y disponible del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Para los fragmentos derivados de la proteína RANK, se calculó la identidad basándose en la porción de la proteína RANK que está presente en el fragmento.

Se puede determinar la actividad biológica de los análogos o de las mutéinas de RANK probando la capacidad de los análogos o de las mutéinas de unirse a RANKL, por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos en el presente documento. Las pruebas adecuadas incluyen por ejemplo, una inmunoprueba enzimática o una inmunotransferencia, y pruebas que emplean células que expresan RANKL. Las pruebas adecuadas incluyen también, por ejemplo, pruebas de inhibición, en las que se usa RANK soluble para inhibir la interacción de RANKL con RANK asociado a fase sólida o unido a membrana (es decir, pruebas de transducción de la señal). Dichos procedimientos son bien conocidos en la materia.

RANKL y RANK son importantes factores en la osteoclastogénesis. RANK se expresa en osteoclastos e interactúa con el ligando de RANK (RANKL) para mediar en la formación de células multinucleadas de tipo osteoclasto (OCL). Se demostró esto tratando preparaciones de médula ósea de ratón con M-CSF (CSF-1) y RANKL soluble durante 7 días en cultivo. No fueron necesarias hormonas o factores osteoclastogénicos para la generación de células multinucleadas. Ni M-CSF ni RANK solos condujeron a la formación de OCL. Las células multinucleadas expresaron fosfatasa ácida resistente a tartrato y fueron positivas a la unión de la [¹²⁵I]- calcitonina. La tirosina cinasa c-src se expresó mucho en OCL multinucleadas y un subconjunto de células mononucleares tal como se demostró mediante microscopio de inmunofluorescencia (Véase el Ejemplo 2).

Purificación de RANK recombinante

Se prepararon RANK purificado, y sus homólogos o análogos cultivando sistemas hospedador/vector adecuados para expresar los productos de traducción recombinantes de los ADN, que se purificaron a continuación de los medios de cultivo o de los extractos celulares. Por ejemplo, se pueden concentrar en primer lugar los sobrenadantes de sistemas que segregan proteínas recombinantes en los medios de cultivo usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

Tras la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender una proteína de contraestructura o lectina o molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetil (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo. La cromatografía de filtración en gel proporciona también un medio de purificación de las proteínas.

La cromatografía de afinidad es un procedimiento particularmente preferido para purificar RANK y sus homólogos. Por

ejemplo, se puede purificar RANK expresada como una proteína de fusión que comprende una región Fc de inmunoglobulina usando la cromatografía de afinidad de la Proteína A o de la Proteína G. Además, se puede purificar una proteína RANK que comprende un dominio en cremallera oligomerizante sobre una resina que comprende un anticuerpo específico del dominio en cremallera oligomerizante. Pueden ser útiles también anticuerpos monoclonales contra la proteína RANK en la purificación mediante cromatografía de afinidad, utilizando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Se puede usar también un ligando para preparar una matriz de afinidad para la purificación por afinidad de RANK.

Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) empleando medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene metilos colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una composición d RANK. Los procedimientos adecuados incluyen los análogos al procedimiento dado a conocer por Urdal y col. (J. Chromatog. 296: 171, 1984). Se pueden emplear alguna o todas las anteriores etapas de purificación, en diferentes combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en un cultivo bacteriano se aísla normalmente mediante la extracción inicial de los aglomerados celulares, seguida de una o varias etapas de concentración y desalinización mediante cromatografía de intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión molecular. Finalmente se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas finales de la purificación. Se pueden perturbar las células microbianas empleadas en la expresión de la proteína recombinante mediante cualquier procedimiento conveniente, incluyendo un ciclo de congelación descongelación, sonicación, perturbación mecánica, o uso de agentes de lisado celular. La fermentación de levaduras que expresa n la proteína como una proteína secretada simplifica mucho la purificación.

La proteína sintetizada en el cultivo recombinante se caracteriza por la presencia de componentes celulares, que incluyen proteínas, en cantidades y de un carácter que depende de las etapas de purificación adoptadas para recuperar la proteína del cultivo. Estos componentes serán ordinariamente de levaduras, de origen procariota o eucariota superior no humano, y están presentes preferiblemente en cantidades contaminantes inocuas, del orden de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso Además, el cultivo celular recombinantes permite la producción de las proteínas exentas de otras proteínas que se pueden asociar normalmente con las proteínas ya que se encuentran en la naturaleza en las especies de origen.

Usos y administración de composiciones de RANK o de una composición que comprende un anticuerpo que se une a un polipéptido rankl y antagoniza la interacción de rank y rankl.

[0031] La presente invención es tal como se detalla en las reivindicaciones. Las composiciones terapéuticas comprenden una proteína y un diluyente y vehículo adecuados.

Normalmente, el individuo está afectado de un exceso de resorción ósea y padece de los efectos de hipercalcemia, tiene los síntomas de la hipercalcemia, o está padeciendo una enfermedad que implica una excesiva resorción ósea. Además, para regular la actividad osteoclástica, el uso o el anticuerpo para el uso tal como se enumera en las reivindicaciones aplicables para inhibir la actividad osteoclástica, que regula la generación de osteoclastos e inhibe la generación de osteoclastos en individuos afligidos con exceso de resorción ósea, tal como se enumera en las reivindicaciones. Se describe el uso de RANK junto con receptores de citocinas o citocinas solubles u otras moléculas reguladoras de osteoclastos/osteoblastos.

Se sabe que el ligando de RANK (RANKL) en osteoblastos o células estromales interactúa con RANK en las superficies de los osteoclastos progenitores señalizando un episodio que conduce a la diferenciación de osteoclastos precursores en osteoclastos. (Véase el Ejemplo 2 a continuación) De esta manera, RANK, y en particular las formas solubles de RANK, es útil para la inhibición de la transducción de la señal medida por RANKL, que conduce a la diferenciación de los osteoclastos precursores en osteoclastos. Las formas solubles de RANK son también útiles para la regulación e inhibición de la actividad osteoclástica, por ejemplo, de la resorción ósea Interfiriendo con la diferenciación osteoclástica, las formas solubles de RANK son útiles en la mejora de los efectos de la osteoclastogénesis en los estados de enfermedad en los que existe un exceso de rotura del hueso. Dichos estados de enfermedad incluyen la enfermedad de Paget, osteoporosis y cáncer. Muchos cánceres metastatizan el hueso e induce la rotura del mismo perturbando localmente la remodelación normal del hueso Dichos cánceres pueden estar asociados con el aumento en el número de osteoclastos y con el aumento en la cantidad de resorción del hueso osteoclástico que da como resultado hipercalcemia. Estos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, mieloma múltiple, melanomas cáncer de pulmón, de próstata, hematológico, de cabeza y de cuello, y renal (véase Guise y col. Endocrine Reviews, 19(1): 18-54, 1998.) Se pueden administrar formas solubles de RANK a dichos pacientes con cáncer para interrumpir la ruta de la diferenciación osteoclástica y dar como resultado un número pequeño de osteoclastos, menor resorción ósea, y el alivio de los efectos negativos de la hipercalcemia.

Otros cánceres no metastatizan el hueso, pero se sabe que actúan sistemáticamente en el hueso para interrumpir la remodelación ósea y dar como resultado hipercalcemia (Véase Guise y col. Endocrine Reviews, 19(1): 18-54, 1998.). Se ha encontrado que RANKL, en la superficie de algunas células escamosas, no metastatiza al hueso, pero está asociado con hipercalcemia. (Véase el Ejemplo 3 a continuación). Las células escamosas que se asocian con hipercalcemia

expresan también M-CSF (CSF-1), una citocina que, junto con RANKL, estimula la proliferación y la diferenciación de osteoclastos precursores en osteoclastos. Se ha descubierto que M-CSF regula en exceso directamente RANK en las superficies de los osteoclastos precursores. Cuando las células escamosas liberan cantidades excesivas de CSF-1, se produce una creciente expresión de RANK en las superficies de los osteoclastos precursores. De esta manera, existe una probabilidad muy elevada de que RANK interactúe con RANKL en los osteoblastos o en las células estromales para producir un creciente número de osteoclastos, dando como resultado un aumento en la cantidad de roturas del hueso e hipercalcemia.

Además de mejorar los efectos de los cánceres que metastatizan el hueso, la presente divulgación describe procedimientos para mejorar los efectos sistémicos, por ejemplo, la hipercalcemia, de los cánceres que están asociados con un exceso en la actividad osteoclástica (por ejemplo, carcinomas de células escamosas). Dichos procedimientos incluyen administrar formas solubles de RANK en cantidades suficientes para interferir con la transducción de la señal RANK/RANKL que conduce a la diferenciación de los osteoclastos precursores en osteoclastos. Muy pocos osteoclastos conducen a reducir la resorción ósea y al alivio de los efectos negativos de la hipercalcemia.

Para uso terapéutico, se formula la proteína purificada para la administración a un individuo, preferiblemente a un ser humano, para el tratamiento de una manera apropiada a la indicación de esta manera, por ejemplo, se pueden formular composiciones de proteína RANK formuladas para la administración para regular la función de los osteoclastos para administración mediante inyección de bolo, infusión continua, liberación continua a partir de implantes, u otra técnica adecuada normalmente, se puede formular un agente terapéutico para la administración en la forma de una composición que comprende RANK purificada, junto con vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Dichos vehículos no serán tóxicos a los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

De manera ordinaria, la preparación de dichas composiciones de proteínas implica combinar la proteína con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos) proteínas, aminoácidos, carbohidratos, incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero de la misma especie son diluyentes apropiados a modo de ejemplo. Preferiblemente el producto se formula como un liofilizado usando disoluciones de excipientes apropiados (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Se pueden determinar las dosificaciones apropiadas en los ensayos. La cantidad y frecuencia de administración dependerán, por supuesto, de dichos factores como la naturaleza y la gravedad de la indicación que se está tratando, la respuesta deseada, la dolencia del paciente, y así sucesivamente.

Se pueden formular formas solubles de RANK y otros antagonistas de RANK tales como anticuerpos monoclonales antagonistas para la administración con el objetivo de inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANK. Es deseable inhibir la osteoclastogénesis en diversos estados de enfermedad en los que se produce una pérdida ósea en exceso. Los ejemplos incluyen osteoporosis, enfermedad de Paget, y diversos cánceres. Se conocen en la técnica algunos modelos animales de estas enfermedades; de acuerdo con esto, es una materia de experimentación rutinaria determinar las dosificaciones y rutas de administración óptimas de RANK soluble, primero en un modelo animal y a continuación en ensayos clínicos en seres humanos.

Se ofrecen los siguientes ejemplos como medio de ilustración, y no como medio de limitación. Los expertos en la materia reconocerán que se pueden realizar variaciones de la invención incorporadas en los ejemplos, especialmente a la luz de las diversas referencias citadas en el presente documento.

40 Ejemplo 1

Este ensayo describe un ensayo de unión a placa útil para comparar la capacidad de algunos ligandos de unirse a receptores. Se llevó a cabo este ensayo esencialmente tal como se describe en Smith y col., *Virology* 236: 316 (1997). De manera breve, se revistieron placas de microvaloración de 96 pocillos con un anticuerpo de una Fc humana (es decir, un anticuerpo políclonal de cabra dirigido contra Fc humana). Se añadieron a continuación proteínas de fusión receptor/Fc, y tras incubación, se lavaron las placas. A continuación se añadieron diluciones en serie. Los ligandos se pueden marcar directamente (es decir, con ^{125}I), o se puede usar un reactivo de detección que está marcado radioactivamente. Tras la incubación, se lavaron las placas, se liberaron específicamente los ligandos unidos, y se cuantificó la cantidad de ligando unido.

Usando este procedimiento, RANK/Fc y OPG/Fc se unieron a placas de 96 pocillos. En un procedimiento indirecto, se detectó una fusión RANKL/resto en cremallera usando un anticuerpo marcado con el resto en cremallera. Se encontró que OPG/Fc se unía a mRANKL a 0,05 nM, y que RANK/Fc se unía a mRANKL a 0,1 nM. Estos valores indican similares afinidades de unión de OPG y RANK para RANKL, confirmando la utilidad de RANK como un inhibidor de la actividad osteoclástica de una manera similar a OPG.

Ejemplo 2 (Ejemplo comparativo)

Lo siguiente describe la formación de células similares a osteoclastos procedentes de médula ósea (MO) de murino en presencia de CSF-1. Estos osteoclastos se formaron mediante la fusión de células de tipo macrófagos y se caracterizaron por su positividad a TRAP (fosfatasa ácida resistente a tartrato). No se observaron células TRAP⁺ en cultivos que contenían CSF-1 solo o en cultivos que contenían CSF-1 y TRAIL LZ (un control para el RANKL LZ soluble).

Incluso aunque la médula ósea de seres humanos y monos contiene más fibroblastos contaminantes que la médula ósea de murino, se generaron osteoclastos a partir de la médula ósea de murino y de mono con la combinación de CSF-1 y RANKL LZ soluble. En un estudio de respuesta a la dosis usando médula ósea de murino y cantidades subóptimas de CSF-1 (40 ng/ml), los efectos de RANKL LZ soluble se interrumpieron a aproximadamente 100 ng/ml.

Se estudió el efecto de RANKL LZ soluble sobre la proliferación de las células en los mismos cultivos usando Azul Alamar. Después de 5 días, la respuesta proliferativa fue inferior en los cultivos que contenían CSF-1 y RANKL LZ que en los que contenían solo CSF-1. Esto apoya la observación de RANKL LZ soluble está induciendo la diferenciación de los osteoclastos. Cuando CSF-1 y RANKL LZ se eliminaron mediante lavado de los cultivos de MO de murino en los días 7 u 8, las células no sobreviven si se vuelven a cultivar en medio o solo en RANKL LZ. E contraste, las células sobreviven si se vuelven a cultivar en CSF-1. Cuando se añadió RANKL LZ a estos cultivos, no se añadieron beneficios. De esta manera, se requiere la combinación de CSF-1 y RANKL para la generación de osteoclastos. Adicionalmente, una vez formado, CSF-1 es suficiente para mantener su supervivencia en el cultivo.

Finalmente, usando médula ósea humana, se compararon mAb soluble dirigido contra RANK humano y mAb inmovilizado dirigido contra RANK humano con RANKL LZ, para la generación de osteoclastos en presencia de CSF-1. Se encontró que M331 inmovilizado y RANKL LZ eran igualmente eficaces para la generación de osteoclastos mientras que M331 soluble fue superior al anticuerpo inmovilizado y a RANKL LZ, esto confirma que la actividad en la diferenciación de los osteoclastos de RANKL está medida a través de RANK más bien que mediante un receptor alternativo.

Debido a que no se pueden cosechar fácilmente los osteoclastos y analizarse mediante citometría de flujo, se utilizaron ensayos de unión a calcitonina marcada con ¹²⁵I para identificar los osteoclastos (se consideró que el receptor de la calcitonina era un marcador específico de osteoclastos). Los osteoclastos generados de la MO de murino cultivada con CSF-1 y RANKL LZ durante 9 días mostraron la unión de la calcitonina radiomarcada confirmando su identidad osteoclástica.

Ejemplo 3 (Ejemplo comparativo)

Con el fin de determinar la expresión de RANKL en dos carcinomas de células escamosas diferentes, se llevaron a cabo la transferencia Western y los estudios de RT-PCR en células MH-85 y OKK. Unas de estas células de carcinoma, las células MH-85 se asocian con hipercalcemia.

Los resultados confirmaron que las células escamosas MH-85 y OKK expresan RANKL. Las células MH-85, además de estar relacionadas con la hipercalcemia en pacientes que padecen este carcinoma, también expresan M-CSF (CSF-1). Se determinó también que CSF-1 regula en exceso la expresión de RANK en osteoclastos precursores. El aumento en la cantidad de CSF-1 en pacientes con cáncer de células escamosas de tipo MH-85 puede conducir a la regulación en exceso de RANK y a un aumento en la interacción de RANK con RANKL. Las señales transducidas por la interacción de RANK y RANKL dan como resultado números crecientes de osteoclastos maduros y rotura de huesos. Debido a que las formas solubles de RANK pueden inhibir la interacción RANK/RANKL, la administración de una forma soluble de RANK (por ejemplo, la región extracelular de RANK fusionada a una FC) a un paciente con cáncer de células escamosas proporciona el alivio de los efectos adversos de este cáncer, incluyendo la hipercalcemia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Immunex Corporation

Anderson, Dirk M.

Galibert, Laurent

<120> TÍTULO DE LA INVENCION: PROCEDIMIENTO PARA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS OSTEOCLASTOS

<130> 2874-WO

<140> PCT/US99/10588 <141> 13-05-1999

<160> 6

<170> PatentIn Ver.2.0

<210> 1

<211> 3136

<212> ADN

5 <213> Ser humano

<220>

<221> CDS

<222> 39..1886

<400> 1

10	CCGCTGAGGC CGCGGCGCCC GCCAGCCTGT CCCGCGCC ATG GCC CCG CGC GCC Met Ala Pro Arg Ala 1 5	53
	CGG CGG CGC CCG CTG TTC GCG CTG CTG CTC TGC GCG CTG CTC Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu 10 15 20	101
15	GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu 25 30 35	149
	AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly 40 45 50	197
	AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu 55 60 65	245
20	CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys 70 75 80 85	293
	TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val 90 95 100	341
25	GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly 105 110 115	389
	TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC	437

ES 2 368 101 T3

	Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys		
	120 125 130		
	GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG CTC AAC AAG GAC ACA	485	
	Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr		
	135 140 145		
	GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT GAT GCC TTT TCC TCC	533	
	Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser		
	150 155 160 165		
5	ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC TTC CTT GGA AAG AGA	581	
	Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg		
	170 175 180		
	GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG GTT TGC AGT TCT TCT	629	
	Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser		
	185 190 195		
	CTG CCA GCT AGA AAA CCA CCA AAT GAA CCC CAT GTT TAC TTG CCC GGT	677	
10	Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His Val Tyr Leu Pro Gly		
	200 205 210		
	TTA ATA ATT CTG CTT CTC TTC GCG TCT GTG GCC CTG GTG GCT GCC ATC	725	
	Leu Ile Ile Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala Leu Val Ala Ala Ile		
	215 220 225		
	ATC TTT GGC GTT TGC TAT AGG AAA AAA GGG AAA GCA CTC ACA GCT AAT	773	
	Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys Ala Leu Thr Ala Asn		
	230 235 240 245		
15	TTG TGG CAC TGG ATC AAT GAG GCT TGT GGC CGC CTA AGT GGA GAT AAG	821	
	Leu Trp His Trp Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg Leu Ser Gly Asp Lys		
	250 255 260		
	GAG TCC TCA GGT GAC AGT TGT GTC AGT ACA CAC ACG GCA AAC TTT GGT	869	
	Glu Ser Ser Gly Asp Ser Cys Val Ser Thr His Thr Ala Asn Phe Gly		
	265 270 275		
	CAG CAG GGA GCA TGT GAA GGT GTC TTA CTG CTG ACT CTG GAG GAG AAG	917	
	Gln Gln Gly Ala Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu Thr Leu Glu Glu Lys		
	280 285 290		
20	ACA TTT CCA GAA GAT ATG TGC TAC CCA GAT CAA GGT GGT GTC TGT CAG	965	
	Thr Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln Gly Gly Val Cys Gln		
	295 300 305		
	GGC ACG TGT GTA GGA GGT GGT CCC TAC GCA CAA GGC GAA GAT GCC AGG	1013	
	Gly Thr Cys Val Gly Gly Pro Tyr Ala Gln Gly Glu Asp Ala Arg		
	310 315 320 325		
	ATG CTC TCA TTG GTC AGC AAG ACC GAG ATA GAG GAA GAC AGC TTC AGA	1061	
	Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu Glu Asp Ser Phe Arg		
25	330 335 340		
	CAG ATG CCC ACA GAA GAT GAA TAC ATG GAC AGG CCC TCC CAG CCC ACA	1109	
	Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg Pro Ser Gln Pro Thr		
	345 350 355		
	GAC CAG TTA CTG TTC CTC ACT GAG CCT GGA AGC AAA TCC ACA CCT CCT	1157	
	Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser Lys Ser Thr Pro Pro		
	360 365 370		
	TTC TCT GAA CCC CTG GAG GTG GGG GAG AAT GAC AGT TTA AGC CAG TGC	1205	
30	Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln Cys		
	375 380 385		

ES 2 368 101 T3

	TTC ACG GGG ACA CAG AGC ACA GTG GGT TCA GAA AGC TGC AAC TGC ACT Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu Ser Cys Asn Cys Thr 390 395 400 405	1253
	GAG CCC CTG TGC AGG ACT GAT TGG ACT CCC ATG TCC TCT GAA AAC TAC Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met Ser Ser Glu Asn Tyr 410 415 420	1301
5	TTG CAA AAA GAG GTG GAC AGT GGC CAT TGC CCG CAC TGG GCA GCC AGC Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro His Trp Ala Ala Ser 425 430 435	1349
	CCC AGC CCC AAC TGG GCA GAT GTC TGC ACA GGC TGC CGG AAC CCT CCT Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly Cys Arg Asn Pro Pro 440 445 450	1397
	GGG GAG GAC TGT GAA CCC CTC GTG GGT TCC CCA AAA CGT GGA CCC TTG Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro Lys Arg Gly Pro Leu 455 460 465	1445
10	CCC CAG TGC GCC TAT GGC ATG GGC CTT CCC CCT GAA GAA GAA GCC AGC Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro Glu Glu Glu Ala Ser 470 475 480 485	1493
	AGG ACG GAG GCC AGA GAC CAG CCC GAG GAT GGG GCT GAT GGG AGG CTC Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly Ala Asp Gly Arg Leu 490 495 500	1541
	CCA AGC TCA GCG AGG GCA GGT GCC GGG TCT GGA AGC TCC CCT GGT GGC Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ser Ser Pro Gly Gly 505 510 515	1589
15	CAG TCC CCT GCA TCT GGA AAT GTG ACT GGA AAC AGT AAC TCC ACG TTC Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe 520 525 530	1637
	ATC TCC AGC GGG CAG GTG ATG AAC TTC AAG GGC GAC ATC ATC GTG GTC Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val 535 540 545	1685
20	TAC GTC AGC CAG ACC TCG CAG GAG GGC GCG GCG GCT GCG GAG CCC Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala Ala Ala Glu Pro 550 555 560 565	1733
	ATG GGC CGC CCG GTG CAG GAG GAC ACC CTG GCG CGC CGA GAC TCC TTC Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Thr Leu Ala Arg Arg Asp Ser Phe 570 575 580	1781
	GCG GGG AAC GGC CCG CGC TTC CCG GAC CCG TGC GGC GGC CCC GAG GGG Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys Gly Gly Pro Glu Gly 585 590 595	1829
25	CTG CGG GAG CCG GAG AAG GCC TCG AGG CCG GTG CAG GAG CAA GGC GGG Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln Gly Gly 600 605 610	1877
	GCC AAG GCT TGAGCGCCCC CCATGGCTGG GAGCCCGAAG CTCGGAGCCA Ala Lys Ala 615	1926
	GGGCTCGCGA GGGCAGCACC GCAGCCTCTG CCCCCAGCCCC GGCCACCCAG GGATCGATCG	1986
30	GTACAGTCGA GGAAGACCAC CCGGCATTCT CTGCCCCACTT TGCCTTCCAG GAAATGGGCT	2046
	TTTCAGGAAG TGAATTGATG AGGACTGTCC CCATGCCAC GGATGCTCAG CAGCCCGCCG	2106
	CACTGGGGCA GATGTCTCCC CTGCCACTCC TCAAACTCGG AGCAGTAATT TGTGGCACTA	2166

TGACAGCTAT	TTTTATGACT	ATCCTGTTCT	GTGGGGGGGG	GGTCTATGTT	TTCCCCCCAT	2226	
ATTTGTATTC	CTTTTCATAA	CTTTTCTTGA	TATCTTCCT	CCCTCTTTT	TAATGTAAAG	2286	
GTTTTCTCAA	AAATTCTCCT	AAAGGTGAGG	GTCTCTTCT	TTTCTCTTT	CCCTTTTTT	2346	
TTCTTTTTT	GGCAACCTGG	CTCTGGCCC	GGCTAGAGTG	CAGTGGTGCG	ATTATAGCCC	2406	
GGTGCAGCCT	CTAACTCCTG	GGCTCAAGCA	ATCCAAGTGA	TCCTCCCACC	TCAACCTTCG	2466	
5	GAGTAGCTGG	GATCACAGCT	GCAGGCCACG	CCCAGCTTCC	TCCCCCGAC	TCCCCCCCCC	2526
CAGAGACACG	GTCCCACCAT	GTTACCCAGC	CTGGTCTCAA	ACTCCCCAGC	TAAAGCAGTC	2586	
CTCCAGCCTC	GGCCTCCCAA	AGTACTGGGA	TTACAGGCGT	GAGCCCCAC	GCTGGCCTGC	2646	
TTTACGTATT	TTCTTTTGTG	CCCCTGCTCA	CAGTGTGTTA	GAGATGGCTT	TCCCAGTGTG	2706	
TGTTCATTGT	AAACACTTTT	GGGAAAGGGC	TAAACATGTG	AGGCCTGGAG	ATAGTTGCTA	2766	
10	AGTTGCTAGG	AACATGTGGT	GGGACTTTCA	TATTCTGAAA	AATGTTCTAT	ATTCTCATTT	2826
TTCTAAAAGA	AAGAAAAAAAG	GAAACCCGAT	TTATTTCTCC	TGAATCTTTT	TAAGTTGTG	2886	
TCGTTCCCTTA	AGCAGAACTA	AGCTCAGTAT	GTGACCTTAC	CCGCTAGGTG	GTAAATTAT	2946	
CCATGCTGGC	AGAGGCACTC	AGGTACTTGG	TAAGCAAATT	TCTAAAACTC	CAAGTTGCTG	3006	
CAGCTTGGCA	TTCTTCTTAT	TCTAGAGGTC	TCTCTGGAAA	AGATGGAGAA	AATGAACAGG	3066	
15	ACATGGGGCT	CCTGGAAAGA	AAGGGCCCGG	GAAGTTCAAG	GAAGAATAAA	GTTGAAATTT	3126
	AAAAAAAAAA						3136

<210> 2

<211> 616

<212> PRT

20 <213> Ser humano

<400> 2:

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

ES 2 368 101 T3

	115	120	125	
	Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln			
	130	135	140	
	Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser			
	145	150	155	160
	Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr			
	165	170	175	
5	Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala			
	180	185	190	
	Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His			
	195	200	205	
	Val Tyr Leu Pro Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala			
	210	215	220	
10	Leu Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys			
	225	230	235	240
	Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp His Trp Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg			
	245	250	255	
	Leu Ser Gly Asp Lys Glu Ser Ser Gly Asp Ser Cys Val Ser Thr His			
	260	265	270	
15	Thr Ala Asn Phe Gly Gln Gln Gly Ala Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu			
	275	280	285	
	Thr Leu Glu Glu Lys Thr Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln			
	290	295	300	
	Gly Gly Val Cys Gln Gly Thr Cys Val Gly Gly Pro Tyr Ala Gln			
	305	310	315	320
	Gly Glu Asp Ala Arg Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu			
	325	330	335	
20	Glu Asp Ser Phe Arg Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg			
	340	345	350	
	Pro Ser Gln Pro Thr Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser			
	355	360	365	
	Lys Ser Thr Pro Pro Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp			
	370	375	380	
25	Ser Leu Ser Gln Cys Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu			
	385	390	395	400
	Ser Cys Asn Cys Thr Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met			
	405	410	415	
	Ser Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro			
	420	425	430	
	His Trp Ala Ala Ser Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly			
	435	440	445	
30	Cys Arg Asn Pro Pro Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro			
	450	455	460	
	Lys Arg Gly Pro Leu Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro			
	465	470	475	480

Glu Glu Glu Ala Ser Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly
 485 490 495

Ala Asp Gly Arg Leu Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly
 500 505 510

Ser Ser Pro Gly Gly Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn
 515 520 525

Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly
 530 535 540

Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala
 545 550 555 560

Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala
 565 570 575

Arg Arg Asp Ser Phe Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys
 580 585 590

Gly Gly Pro Glu Gly Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val
 595 600 605

Gln Glu Gln Gly Gly Ala Lys Ala
 610 615

<210> 3

<211> 232

15 <212> PRT

<213> Ser humano

<400> 3

Glu Pro Arg Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Asp Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Met Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160

His Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

ES 2 368 101 T3

165

170

175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

5

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 4

<211> 1878

<212> ADN

10 <213> Murino

<220>

<221> CDS

<222> 1.1875

<400> 4

15 ATG GCC CCG CGC GCC CGG CGG CGC CAG CTG CCC GCG CCG CTG CTG 48
 Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu
 1 5 10 15

GGC CTC TGC GTG CTG CTC GTT CCA CTG CAG GTG ACT CTC CAG GTC ACT 96
 Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr
 20 25 30

20 CCT CCA TGC ACC CAG GAG AGG CAT TAT GAG CAT CTC GGA CGG TGT TGC 144
 Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys
 35 40 45

AGC AGA TGC GAA CCA GGA AAG TAC CTG TCC TCT AAG TGC ACT CCT ACC 192
 Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr
 50 55 60

TCC GAC AGT GTG TGT CTG CCC TGT GGC CCC GAT GAG TAC TTG GAC ACC 240
 Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr
 65 70 75 80

25 TGG AAT GAA GAA GAT AAA TGC TTG CTG CAT AAA GTC TGT GAT GCA GGC 288
 Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly
 85 90 95

AAG GCC CTG GTG GCG GTG GAT CCT GGC AAC CAC ACG GCC CCG CGT CGC 336
 Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg
 100 105 110

TGT GCT TGC ACG GCT GGC TAC CAC TGG AAC TCA GAC TGC GAG TGC TGC 384
 Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys
 115 120 125

30 CGC AGG AAC ACG GAG TGT GCA CCT GGC TTC GGA GCT CAG CAT CCC TTG 432
 Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu
 130 135 140

CAG CTC AAC AAG GAT ACG GTG TGC ACA CCC TGC CTC CTG GGC TTC TTC 480
 Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe
 145 150 155 160

ES 2 368 101 T3

	TCA GAT GTC TTT TCG TCC ACA GAC AAA TGC AAA CCT TGG ACC AAC TGC Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys 165 170 175	528
	ACC CTC CTT GGA AAG CTA GAA GCA CAC CAG GGG ACA ACG GAA TCA GAT Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp 180 185 190	576
5	GTG GTC TGC AGC TCT TCC ATG ACA CTG AGG AGA CCA CCC AAG GAG GCC Val Val Cys Ser Ser Met Thr Leu Arg Arg Pro Pro Lys Glu Ala 195 200 205	624
	CAG GCT TAC CTG CCC AGT CTC ATC GTT CTG CTC CTC TTC ATC TCT GTG Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ile Ser Val 210 215 220	672
10	GTA GTA GTG GCT GCC ATC ATC TTC GGC GTT TAC TAC AGG AAG GGA GGG Val Val Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly 225 230 235 240	720
	AAA GCG CTG ACA GCT AAT TTG TGG AAT TGG GTC AAT GAT GCT TGC AGT Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp Asn Trp Val Asn Asp Ala Cys Ser 245 250 255	768
	AGT CTA AGT GGA AAT AAG GAG TCC TCA GGG GAC CGT TGT GCT GGT TCC Ser Leu Ser Gly Asn Lys Glu Ser Ser Gly Asp Arg Cys Ala Gly Ser 260 265 270	816
15	CAC TCG GCA ACC TCC AGT CAG CAA GAA GTG TGT GAA GGT ATC TTA CTA His Ser Ala Thr Ser Ser Gln Gln Glu Val Cys Glu Gly Ile Leu Leu 275 280 285	864
	ATG ACT CGG GAG AAG ATG GTT CCA GAA GAC GGT GCT GGA GTC TGT Met Thr Arg Glu Glu Lys Met Val Pro Glu Asp Gly Ala Gly Val Cys 290 295 300	912
	GGG CCT GTG TGT GCG GCA GGT GGG CCC TGG GCA GAA GTC AGA GAT TCT Gly Pro Val Cys Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Glu Val Arg Asp Ser 305 310 315 320	960
20	AGG ACG TTC ACA CTG GTC AGC GAG GTT GAG ACG CAA GGA GAC CTC TCG Arg Thr Phe Thr Leu Val Ser Glu Val Glu Thr Gln Gly Asp Leu Ser 325 330 335	1008
	AGG AAG ATT CCC ACA GAG GAT GAG TAC ACG GAC CGG CCC TCG CAG CCT Arg Lys Ile Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Pro Ser Gln Pro 340 345 350	1056
25	TCG ACT GGT TCA CTG CTC CTA ATC CAG CAG GGA AGC AAA TCT ATA CCC Ser Thr Gly Ser Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gly Ser Lys Ser Ile Pro 355 360 365	1104
	CCA TTC CAG GAG CCC CTG GAA GTG GGG GAG AAC GAC AGT TTA AGC CAG Pro Phe Gln Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln 370 375 380	1152
	TGT TTC ACC GGG ACT GAA AGC ACG GTG GAT TCT GAG GGC TGT GAC TTC Cys Phe Thr Gly Thr Glu Ser Thr Val Asp Ser Glu Gly Cys Asp Phe 385 390 395 400	1200
30	ACT GAG CCT CCG AGC AGA ACT GAC TCT ATG CCC GTG TCC CCT GAA AAG Thr Glu Pro Pro Ser Arg Thr Asp Ser Met Pro Val Ser Pro Glu Lys 405 410 415	1248
	CAC CTG ACA AAA GAA ATA GAA GGT GAC AGT TGC CTC CCC TGG GTG GTC His Leu Thr Lys Glu Ile Glu Gly Asp Ser Cys Leu Pro Trp Val Val	1296

	420	425	430	
	AGC TCC AAC TCA ACA GAT GGC TAC ACA GGC AGT GGG AAC ACT CCT GGG Ser Ser Asn Ser Thr Asp Gly Tyr Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Gly 435	440	445	1344
5	GAG GAC CAT GAA CCC TTT CCA GGG TCC CTG AAA TGT GGA CCA TTG CCC Glu Asp His Glu Pro Phe Pro Gly Ser Leu Lys Cys Gly Pro Leu Pro 450	455	460	1392
	CAG TGT GCC TAC AGC ATG GGC TTT CCC AGT GAA GCA GCA GCC AGC ATG Gln Cys Ala Tyr Ser Met Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met 465	470	475	1440
	GCA GAG GCG GGA GTA CGG CCC CAG GAC AGG GCT GAT GAG AGG GGA GCC Ala Glu Ala Gly Val Arg Pro Gln Asp Arg Ala Asp Glu Arg Gly Ala 485	490	495	1488
10	TCA GGG TCC GGG AGC TCC CCC AGT GAC CAG CCA CCT GCC TCT GGG AAC Ser Gly Ser Ser Pro Ser Asp Gln Pro Pro Ala Ser Gly Asn 500	505	510	1536
	GTG ACT GGA AAC AGT AAC TCC ACG TTC ATC TCT AGC GGG CAG GTG ATG Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met 515	520	525	1584
15	AAC TTC AAG GGT GAC ATC ATC GTG GTG TAT GTC AGC CAG ACC TCG CAG Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln 530	535	540	1632
	GAG GGC CCG GGT TCC GCA GAG CCC GAG TCG GAG CCC GTG GGC CGC CCT Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro 545	550	555	1680
	GTG CAG GAG GAG ACG CTG GCA CAC AGA GAC TCC TTT GCG GGC ACC GCG Val Gln Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala 565	570	575	1728
20	CCG CGC TTC CCC GAC GTC TGT GCC ACC GGG GCT GGG CTG CAG GAG CAG Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln 580	585	590	1776
	GGG GCA CCC CGG CAG AAG GAC GGG ACA TCG CGG CCG GTG CAG GAG CAG Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln 595	600	605	1824
25	GGT GGG GCG CAG ACT TCA CTC CAT ACC CAG GGG TCC GGA CAA TGT GCA Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala 610	615	620	1872
	GAA TGA Glu 625			1878
	<210> 5			
	<211> 625			
30	<212> PRT			
	<213> Murino			
	<400> 5			
	Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu 1 5 10 15			
	Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr			

ES 2 368 101 T3

	20	25	30
	Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys		
	35	40	45
	Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr		
	50	55	60
5	Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr		
	65	70	75
	Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly		
	85	90	95
	Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg		
	100	105	110
10	Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys		
	115	120	125
	Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu		
	130	135	140
	Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe		
	145	150	155
	Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys		
	165	170	175
15	Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp		
	180	185	190
	Val Val Cys Ser Ser Ser Met Thr Leu Arg Arg Pro Pro Lys Glu Ala		
	195	200	205
	Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ile Ser Val		
	210	215	220
20	Val Val Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly		
	225	230	235
	Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp Asn Trp Val Asn Asp Ala Cys Ser		
	245	250	255
	Ser Leu Ser Gly Asn Lys Glu Ser Ser Gly Asp Arg Cys Ala Gly Ser		
	260	265	270
25	His Ser Ala Thr Ser Ser Gln Gln Glu Val Cys Glu Gly Ile Leu Leu		
	275	280	285
	Met Thr Arg Glu Glu Lys Met Val Pro Glu Asp Gly Ala Gly Val Cys		
	290	295	300
	Gly Pro Val Cys Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Glu Val Arg Asp Ser		
	305	310	315
	Arg Thr Phe Thr Leu Val Ser Glu Val Glu Thr Gln Gly Asp Leu Ser		
	325	330	335
30	Arg Lys Ile Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Pro Ser Gln Pro		
	340	345	350
	Ser Thr Gly Ser Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gly Ser Lys Ser Ile Pro		
	355	360	365
	Pro Phe Gln Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln		
	370	375	380

ES 2 368 101 T3

	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Glu	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Asp	Phe
	385					390					395					400
	Thr	Glu	Pro	Pro	Ser	Arg	Thr	Asp	Ser	Met	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Lys
						405				410					415	
	His	Leu	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Val	Val
						420			425					430		
5	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Pro	Gly
						435		440						445		
	Glu	Asp	His	Glu	Pro	Phe	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Cys	Gly	Pro	Leu	Pro
						450		455				460				
	Gln	Cys	Ala	Tyr	Ser	Met	Gly	Phe	Pro	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Met
						465		470			475					480
10	Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Ala
						485			490					495		
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn
						500			505					510		
	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met
						515			520					525		
	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln
						530			535					540		
15	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Arg	Pro
						545		550			555				560	
	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	His	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ala
						565			570					575		
	Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Val	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln
						580			585					590		
20	Gly	Ala	Pro	Arg	Gln	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Gln
						595		600					605			
	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Gly	Gln	Cys	Ala
						610		615					620			
	Glu															
		625														
25	<210> 6															
	<211> 33															
	<212> PRT															
	<213> Murino															
	<400> 6															
30	Arg	Met	Lys	Gln	Ile	Glu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	Ser	Lys	Ile
	1				5				10						15	
	Tyr	His	Ile	Glu	Asn	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	Ile	Glu	
						20			25					30		
	Arg															

REIVINDICACIONES

- 1.** Un anticuerpo que se une a un polipéptido RANKL y antagoniza la interacción de RANK y RANKL para uso en la mejora de los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica en un paciente con mieloma múltiple.
- 2.** El anticuerpo para el uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 5 **3.** El anticuerpo para el uso tal como se reivindica en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en el que la mejora en los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica disminuye la resorción ósea en exceso.
- 4.** Uso de un anticuerpo que se une a un polipéptido RANKL y antagoniza la interacción de RANK y RANKL en la fabricación de un medicamento para mejorar los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica en un paciente con mieloma múltiple.
- 10 **5.** Uso, tal como se reivindica en la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 6.** Uso, tal como se reivindica en la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la mejora en los efectos de la osteoclastogénesis y la actividad osteoclástica disminuye la resorción ósea en exceso.