

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 854**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2008 E 08771835 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2176294**

54 Título: **Usos de antagonistas MDL-1**

30 Prioridad:

29.06.2007 US 947314 P

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

14.07.2015

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**BIGLER, MICHAEL E.;
CUA, DANIEL J.;
JOYCE-SHAIKH, BARBARA y
PHILLIPS, JOSEPH H.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 540 854 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

Usos de antagonistas MDL-1

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para el tratamiento de trastornos esqueléticos e inmunes por modulación de la actividad de MDL-1.

10 Antecedente de la invención

El tejido óseo se compone principalmente de tres tipos de células (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) y una matriz ósea intercelular mineralizada que comprende polímeros (principalmente fibras de colágeno) y otras sustancias orgánicas (sustancia fundamental, compuesta principalmente por proteoglicanos tales como condroitinsulfato y ácido hialurónico) sintetizadas por las células óseas (principalmente osteoblastos). Las células óseas producen las moléculas orgánicas de la matriz ósea y también modulan su mineralización. Los osteoblastos están ubicados en las superficies del tejido óseo y sintetizan los componentes orgánicos de la matriz ósea. Los osteocitos son osteoblastos maduros e intervienen en el mantenimiento de la matriz ósea. Los osteoclastos intervienen en la erosión y la resorción ósea.

El equilibrio entre la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos es esencial para la homeostasis ósea. La desregulación de este equilibrio puede llevar a una activación excesiva de osteoclastos y a enfermedades óseas resortivas tales como osteoporosis y osteoartritis. El receptor activador del ligando NF- κ B (RANKL) –que activa TRAF6, c-Fos y los factores de transcripción de NFATc1– es una importante citocina reguladora que provee señales primarias para el desarrollo y la función de los osteoclastos. Otras señales derivadas de las moléculas que contienen el motivo de activación de inmunoreceptor basada en tirosina (ITAM) también son esenciales para la osteoclastogénesis *in vivo*.

DAP 12 (proteína activadora de DNAX) es una glucoproteína transmembrana homodimérica tipo I con enlace disulfuro que contiene un motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM), ubicado en el dominio intracelular (Lanier, et al. (1998) *Nature* 391:703-707; WO 99/06557; Campbell y Colonna (1999) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:631-636; Lanier y Bakker (2000) *Immunol. Today* 21:611-614). La importancia de DAP12 depende del dominio ITAM (Gingras et al. (2001) *Mol. Immun.* 38:817-824). Dado que el dominio intracelular de los receptores de la superfamilia de Ig (Bouchon et al. (2000) *J. Immunol.* 164: 4991-4995; Dietrich et al. (2000) *J. Immunol.* 164:9-12) y la superfamilia de lectina de tipo C (Bakker et al. (1999) *PNAS U.S.A.* 96:9792-9796) que se asocian en forma no covalente con DAP12 es demasiado corto para permitir la interacción con otras moléculas, el dominio citoplasmático DAP12 constituye la subunidad de señal de estos complejos de receptores. Después de unirse a la subunidad fijadora del ligando del receptor, el ITAM citoplasmático DAP12 es fosforilado por Src cinasas. El ITAM de DAP12 interactúa entonces con las tirocinasas citoplasmáticas Syk, que inician una cascada de eventos que conducen a la activación (Lanier et al., *supra*; Campbell y Colonna, *supra*; Lanier y Bakker, *supra*).

DAP 12 se expresa en monocitos, macrófagos, células natural killer (NK), granulocitos, células dendríticas y mastocitos, donde provee la función de señal para al menos ocho receptores diferenciados (Gingras et al. (2001) *Mol. Immun.* 38:817-824; Lanier y Bakker, (2000) *Immunol. Today* 21:611-614). El receptor mielóide de la superfamilia de lectinas de tipo C asociado con DAP 12 es la lectina-1 mielóide de asociación a DAP12 (MDL-1), una proteína transmembrana de tipo II (MDL1 también es referida como CLEC5a). MDL-1 fue la primera molécula de asociación a DAP 12 identificada y clonada (Bakker et al. (1999) *PNAS USA* 96(17):9792-9796). Se expresa exclusivamente en monocitos y macrófagos (Bakker et al. (1999) *PNAS U.S.A.* 96:9792-9796) así como sobre otros tipos de células mieloides tales como neutrófilos y células dendríticas. La presencia de un residuo con carga negativa en el dominio transmembrana de DAP12 impide su expresión en la superficie celular en ausencia de un socio receptor, tal como MDL-1, que tiene un residuo con carga positiva en su dominio transmembrana. No obstante, DAP 12 solo no es suficiente para su expresión y función en la superficie celular. En consecuencia, la combinación de una molécula de asociación a DAP12, tal como MDL-1, y DAP 12 puede ser responsable de transmitir una señal fisiológica particular a través de DAP12 (Nochi et al. (2003) *Am. J. de Pathology* 162:1191-1201).

Estudios recientes han demostrado que se requieren señales coestimuladoras mediadas por la vía de señales DAP12-ITAM para el desarrollo de osteoclastos (véase, p.ej., Koga, et al. (2004) *Nature* 428:758-763); ratones *Dap12*^{-/-} presentan un defecto de desarrollo de osteoclastos (véase, p.ej., Humphrey, et al. (2004) *J Bone Miner Res* 19:224-234); la inactivación de DAP-12 puede dar por resultado quistes de los huesos de la muñeca y el tobillo, demencia (véase, p.ej., Paloneva, et al. (2002) *Nature Genetics* 25:357-361; y Paloneva, et al. (2001) *Neurology* 56:1552-1558).

Se ha demostrado que la acción del virus causal de fiebre Dengue sobre MDL-1 induce la fosforilación de DAP-12 y estimula la liberación de citocinas proinflamatorias (véase, Chen et al. (2008) *Nature*, publicación online doi:10.1038/nature07013:1-7). Es interesante destacar que la fiebre Dengue también ha sido llamada "fiebre

quebrantahuesos" debido al atroz dolor de extremidades asociado con la infección viral activa (véase, p.ej., Clarke (2002) Nature 416:672-674).

5 WO-A-2007088051 (Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft) publicada después de la fecha de prioridad describe una proteína de fusión MDL-1 que modula la actividad de MDL-1 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como artritis, esclerosis múltiple y enfermedad inflamatoria intestinal.

10 Normalmente, la inflamación es una respuesta protectora localizada contra un traumatismo o una invasión microbiana, que destruye, diluye o rodea el agente perjudicial y el tejido lesionado. En la forma aguda, se caracteriza por los clásicos signos de dolor, calor, rubor, tumefacción y pérdida de función. Microscópicamente, comprende una serie compleja de eventos que incluyen dilatación de las arteriolas, los capilares y las vénulas, con incremento de la permeabilidad y el flujo sanguíneo, exudación de fluidos, incluso las proteínas plasmáticas, y migración de leucocitos hacia la zona de la inflamación.

15 Hay evidencias crecientes de que la mera detención de la inflamación podría no ser adecuada para el tratamiento de la desregulación resultante del metabolismo óseo. En consecuencia, es necesario que las estrategias terapéuticas incorporen actividades anti-resorción ósea y antiinflamatorias. La presente invención cubre esta necesidad al proporcionar agentes y métodos para modular los trastornos de densidad ósea mediante agonistas de la actividad de MDL-1 con el fin de revertir la resorción ósea y suprimir la inflamación simultáneamente.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que la activación de MDL-1 aumenta la liberación de mediadores inflamatorios inducidos por LPS.

25 La Figura 2 muestra la exacerbación de CIA por la administración del anticuerpo del agonista de MDL-1, DX163.

La Figura 3 muestra la inhibición de CAIA por la Proteína de fusión MDL-1-Ig antagonista de MDL-1.

30 La Figura 4 muestra valores clínicos disminuidos de CAIA en ratones MDL-1 KO.

La Figura 5 confirma que al afectar la actividad de MDL-1 con el anticuerpo del agonista de MDL-1, DX163, se puede exacerbar el desarrollo de artritis autoinmune.

35 La Figura 6 muestra la inhibición de CAIA con Proteína de fusión MDL-1-Ig.

La Figura 7 muestra las patas de ratones B10RIII escaneadas con escáner de TC GE explore.

40 La Figura 8 muestra que los niveles de expresión de mRNA de los genes asociados con destrucción ósea tales como RANKL, metaloproteasa de matriz 9 (MMP9) y TRAP estaban regulados hacia arriba en las patas después del tratamiento con agonista anti-MDL-1, y regulados hacia abajo en el tratamiento de fusión con MDL-1-Ig.

45 La Figura 9 muestra que el tratamiento con RANK-L en combinación con anticuerpo del agonista anti-MDL-1 incrementa la expresión del "regulador maestro de la transcripción" de osteoclastos NFATc1.

Síntesis de la invención

50 La presente invención se basa en el descubrimiento de que los antagonistas de la actividad de MDL-1 inhiben la erosión ósea y la inflamación. Se proporciona un anticuerpo o el correspondiente fragmento de anticuerpo que fija específicamente MDL-1 (SEQ ID NO:2 o 4) o una proteína MDL-1 soluble (SEQ ID NO:2 o 4), para usar en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad caracterizada por pérdida ósea. En ciertas formas de realización, el anticuerpo es humanizado, totalmente humano o quimérico. El fragmento de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab2 o Fv. El anticuerpo o el correspondiente fragmento de anticuerpo se pueden conjugar a otro resto químico, incluso polietilenglicol (PEG). El anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe la resorción ósea, incluso la resorción ósea causada por inflamación. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo también inhibe la formación o activación de los osteoclastos.

60 En ciertas formas de realización, la proteína MDL-1 soluble se conjuga a un resto químico, incluso PEG. En otras formas de realización, la proteína MDL-1 soluble se fusiona a una proteína heteróloga, incluso una porción Fc de una molécula de anticuerpo. La proteína MDL-1 soluble inhibe la resorción ósea, incluso la resorción ósea causada por inflamación. La proteína MDL-1 soluble también inhibe la formación o activación de los osteoclastos.

Definiciones

65

Tal como se usa en la presente, el término "glóbulos blancos sanguíneos" se refiere a una célula sanguínea que no contiene hemoglobina. Un glóbulo blanco sanguíneo también se denomina leucocito. Los glóbulos blancos sanguíneos incluyen linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos.

5 Tal como se usa en la presente, el término "estado de expresión" se usa para referirse en sentido amplio a la variedad de factores que intervienen en la expresión, función y regulación de un gen y sus productos, tales como el nivel de expresión de mRNA, la integridad de los productos de expresión de los genes (tales como las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos), y las modificaciones de transcripción y de traducción de estas moléculas.

10 Tal como se usa en la presente, el término "molécula de anticuerpo" se refiere a los anticuerpos completos (p.ej., IgG, de preferencia, IgG1 o IgG4) y sus fragmentos, de preferencia los fragmentos fijadores de antígeno. Los fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos de anticuerpo Fab, los fragmentos de anticuerpo F(ab)₂, los fragmentos de anticuerpo Fv, los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena simple y los fragmentos de anticuerpo dsFv.

15 Tal como se usa en la presente, el término "sujeto", "paciente" o "huésped" se refiere a cualquier organismo, de preferencia un animal, con mayor preferencia un mamífero (p.ej., ratón, rata, conejo, vaca, perro, gato, vaca, chimpancé, gorila) y con mayor preferencia aún un ser humano.

20 Tal como se usa en la presente, el término "control" incluye: un paciente sin un trastorno inmune; una muestra de un paciente sin un trastorno inmune; una muestra sin enfermedad de un paciente con un trastorno inmune.

25 Tal como se usa en la presente, los términos "administración" y "tratamiento", cuando se aplican a un animal, humano, sujeto de experimentación, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refieren al contacto de un agente, compuesto o composición farmacéutico, terapéutico o diagnóstico exógeno al animal, humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. "Administración" y "tratamiento" también significan tratamientos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

30 Tal como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" de un agente terapéutico se define como una cantidad de cada componente activo de la formulación farmacéutica que es suficiente para mostrar un beneficio significativo del paciente, es decir, causar un descenso, prevención o mejora de los síntomas de la condición tratada. Cuando la formulación farmacéutica comprende un agente diagnóstico, "una cantidad terapéuticamente efectiva" se define como una cantidad suficiente para producir una señal, imagen u otro parámetro de diagnóstico. Las cantidades efectivas de la formulación farmacéutica variarán de acuerdo con factores tales como el grado de susceptibilidad del individuo, la edad, el género y el peso del individuo, y las respuestas idiosincráticas del individuo, véase, p.ej., Patente de los Estados Unidos No. 5.888.530.

40 Tal como se usa en la presente, el término "exógeno" se refiere a sustancias que son producidas fuera de un organismo, célula o cuerpo humano, según el contexto. Tal como se usa en la presente, el término "endógeno" se refiere a sustancias que son producidas dentro de una célula, un organismo o un cuerpo humano, según el contexto.

45 Tal como se usa en la presente, el término "recombinante" se refiere a dos o más ácidos nucleicos o proteínas que no son naturalmente contiguas y que se fusionan entre sí. El término también se puede referir a un ácido nucleico o una proteína que ha sido alterado (p.ej., modificado o mutado después de la traducción) por intervención humana. Por ejemplo, un codón de tipo silvestre puede ser reemplazado por un codón redundante que codifica el mismo residuo de aminoácido o una sustitución conservadora, al mismo tiempo que se introduce o extrae un sitio de reconocimiento de una secuencia de ácido nucleico. De modo similar, los segmentos de ácido nucleico que codifican funciones deseadas se pueden fusionar para generar una única entidad genética que codifica una combinación deseada de funciones que no se encuentran juntas en la naturaleza. Si bien los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción a menudo son el blanco de estas manipulaciones artificiales, se pueden incorporar por diseño otros blancos específicos de sitio, p.ej., promotores, sitios de replicación de ADN, secuencias reguladoras, secuencias control u otras características útiles. También se pueden incorporar secuencias que codifican rótulos de epitopo para la detección o purificación, tal como se describe más adelante.

55 Tal como se usa en la presente, el término "polinucleótido", "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica de éster de fosfato de los ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquiera de sus análogos fosfoéster, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma monocatenaria, bicatenaria o de otro tipo.

60 Tal como se usa en la presente, el término "secuencia de polinucleótido", "secuencia de ácido nucleico" o "secuencia de nucleótido" se refiere a una serie de bases de nucleótido (también denominados "nucleótidos") en un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, y significa cualquier cadena de dos o más nucleótidos.

65 Tal como se usa en la presente, el término "secuencia codificadora" o una secuencia "que codifica" se refiere a un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, una secuencia de nucleótido que, cuando se expresa, da por resultado la producción del producto.

Tal como se usa en la presente, el término "gen" significa una secuencia de ADN que codifica o se corresponde con una secuencia de ribonucleótidos o aminoácidos particular que comprende la totalidad o parte de una o más moléculas de ARN, proteínas o enzimas, y que puede o no incluir secuencias de ADN reguladoras, tales como

5 secuencias promotoras, las cuales determinan, por ejemplo, las condiciones en las cuales se expresa el gen. Los genes pueden ser transcritos de AND a ARN, que puede o no ser traducido a una secuencia de aminoácidos.

Tal como se usa en la presente, el término "amplificación" de ADN se refiere al uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para incrementar la concentración de una secuencia de ADN particular dentro de una mezcla de

10 secuencias de ADN. Para una descripción de PCR véase Saiki, et al., Science (1988) 239: 487.

Tal como se usa en la presente, el término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico, generalmente de al menos 10 nucleótidos, p.ej., 10, 11, 12, 13 o 14, de preferencia al menos 15 p.ej., 15, 16, 17, 18 o 19, y con mayor preferencia al menos 20 nucleótidos p.ej., 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, de preferencia no más de 100

15 nucleótidos p.ej., 40, 50, 60, 70, 80 o 90, que se pueden hibridar a una molécula de ADN genómica, una molécula de cADN o una molécula de mRNA que codifica un gen, mRNA, cADN, u otro ácido nucleico de interés. Los oligonucleótidos pueden ser rotulados, p.ej., por incorporación de ³²P-nucleótidos, ³H-nucleótidos, ¹⁴C-nucleótidos, ³⁵S-nucleótidos o nucleótidos a los cuales se ha conjugado covalentemente un rótulo, tal como biotina. En una forma de realización, se puede usar un oligonucleótido rotulado como sonda para detectar la presencia de un ácido

20 nucleico. En otra forma de realización, se pueden usar oligonucleótidos (donde uno o ambos pueden ser rotulados) como cebadores de PCR, ya sea para clonar el gen de longitud total o un fragmento del gen, o detectar la presencia de ácidos nucleicos. Generalmente, los oligonucleótidos se preparan por síntesis, de preferencia en un sintetizador de ácidos nucleicos.

Tal como se usa en la presente, los términos "promotor" o "secuencia promotora" se refieren a una región reguladora del ADN capaz de fijar una ARN polimerasa en una célula (p.ej., directamente o a través de otras proteínas o sustancias ligadas al promotor) e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora. En general, se fija una

25 secuencia promotora en su terminal 3' en el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende corriente arriba (dirección 5') para incluir la mínima cantidad de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en cualquier nivel. Dentro de la secuencia promotora se puede encontrar un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente, por ejemplo, por mapeo con nucleasa S1), así como los dominios fijadores de proteína (secuencias de consenso) responsables de la fijación de ARN polimerasa. El promotor puede ser asociado en forma operativa con otras secuencias de control de expresión, incluso secuencias incentivadoras y represoras, o con un

35 ácido nucleico de la invención.

Tal como se usa en la presente, los términos "expresa" y "expresión" significan permitir o ser la causa de que se manifieste la información en un gen, o secuencia de ARN o ADN; por ejemplo, producir una proteína por activación de las funciones celulares que intervienen en la transcripción y traducción del gen correspondiente. Una secuencia de ADN es expresada dentro o por una célula para formar un "producto de expresión" tal como un ARN (p.ej.,

40 mRNA) o una proteína (p.ej., un anticuerpo o uno de sus fragmentos). También se puede decir que el propio producto de expresión es "expresado" por la célula.

Tal como se usa en la presente, los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo (p.ej., un plásmido) por el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, a fin de transformar el huésped y, opcionalmente, promover la expresión y/o la replicación de la secuencia introducida.

45

Tal como se usa en la presente, el término "transfección" o "transformación" significa la introducción de un ácido nucleico en una célula. El gen o la secuencia introducidos se pueden denominar "clon". Una célula huésped que recibe el ADN o ARN introducido ha sido "transformada" y es un "transformante" o "clon". El ADN o ARN introducido en una célula huésped puede provenir de cualquier fuente, incluso células del mismo género o especie que la célula huésped, o células de diferente género o especie.

50

Tal como se usa en la presente, el término "célula huésped" significa cualquier célula de cualquier organismo que es seleccionada, modificada, transfectada, transformada, cultivada, o usada o manipulada de cualquier forma, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo la expresión o la replicación, por la célula, de un gen, una

55 secuencia de ADN o ARN, una proteína o una enzima.

Tal como se usa en la presente, el término "sistema de expresión" significa una célula huésped y un vector compatible que, en condiciones adecuadas, puede expresar una proteína o un ácido nucleico que es transportado por el vector e introducida en la célula huésped. Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores plásmidos, células huésped de insectos y vectores Baculovirus, y células huésped y vectores de mamíferos. Las células adecuadas incluyen células CHO (de ovario de hámster chino), células HeLa y células NIH 3T3 y células NSO (línea celular de mieloma murino no productora de Ig). Los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o un fragmento fijador de antígeno de la invención pueden ser expresados en elevadas concentraciones en un sistema de expresión *E.coli*/T7 tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos No. 4.952.496;

60

65

5.693.489 y 5.869.320 y en Davanloo et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2035-2039; Studier et al., (1986) J. Mol. Biol. 189: 113-130; Rosenberg et al., (1987) Gene 56:125-135; y Dunn et al., (1988) Gene 68:259.

Tal como se usa en la presente, el término "sustitución conservadora" se refiere a sustituciones de aminoácidos conocidas por los expertos en la técnica y pueden ser realizados generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones únicas en aminoácidos en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p.ej., Watson, et al., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4° Edición 1987)). Tales ejemplos de sustituciones de preferencia se realizan de conformidad con las establecidas en la TABLA 1 como sigue:

TABLA 1

Residuo original	Sustitución conservadora
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

15 También se permiten otras sustituciones y pueden ser determinadas en forma empírica o de acuerdo a sustituciones conservadoras conocidas.

Tal como se usa en la presente, el término "ácido nucleico aislado" o "polipéptido aislado" se puede referir a un ácido nucleico, tal como una molécula de ARN o ADN o un polímero mixto, o a un polipéptido, respectivamente, que está separado en parte o totalmente de otros componentes que se encuentran normalmente en células o en sistemas de expresión de ADN recombinante. Estos componentes incluyen, sin limitaciones, membranas celulares, paredes celulares, ribosomas, polimerasas, componentes séricos y secuencias genómicas flanqueadoras. En consecuencia, el término incluye un ácido nucleico que ha sido extraído de su ambiente natural y puede incluir aislamientos recombinantes o clonados de ADN y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Un ácido nucleico o polipéptido aislado, de preferencia, será una composición esencialmente homogénea de moléculas, pero puede contener cierta heterogeneidad.

Tal como se usa en la presente, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" incluyen todas dichas modificaciones, particularmente las que están presentes en polipéptidos sintetizados por la expresión de un polinucleótido en una célula huésped.

Tal como se usa en la presente, el término "antisentido" se refiere a cualquier composición que contiene secuencias de nucleótidos que son complementarios a una secuencia de ADN o ARN específica. El término "cadena antisentido" se usa en referencia a una cadena de ácido nucleico que es complementaria a la cadena "con sentido". Las moléculas antisentido incluyen ácidos nucleicos peptídicos y pueden ser producidos por cualquier método que incluya una síntesis o transcripción. Una vez introducidos en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con secuencias naturales producidas por la célula para formar dobletes y bloquear la transcripción o la traducción. La designación "negativa" se usa en ocasiones en referencia a la cadena antisentido, y "positiva" se usa en ocasiones en referencia a la cadena con sentido.

Tal como se usa en la presente, el término "determinante antigénico" se refiere al fragmento de una molécula (es decir, un epitopo) que entra en contacto con un anticuerpo particular. Cuando una proteína o fragmento de una proteína se usa para inmunizar a un huésped animal, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se fijan específicamente a determinada región o estructura tridimensional sobre la proteína; estas regiones o estructuras se denominan determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede

competir con el antígeno intacto (es decir, el inmunógeno usado para generar la respuesta inmune) para la fijación de un anticuerpo.

5 Tal como se usa en la presente, el término "molécula de anticuerpo" incluye, sin limitaciones, anticuerpos y sus fragmentos, de preferencia los fragmentos fijadores de antígeno. El término incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos biespecíficos, fragmentos Fab de anticuerpos, fragmentos F(ab)₂ de anticuerpos, fragmentos Fv de anticuerpos (p.ej., V_H o V_L), fragmentos Fv de anticuerpos de cadena única (scFv) y fragmentos dsFv de anticuerpos. Además, las moléculas de anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos totalmente humanos o anticuerpos quiméricos.

10 Tal como se usa en la presente, el término "K_{off}" se refiere a la constante de disociación fuera de la proteína del anticuerpo de un complejo anticuerpo/antígeno.

15 Tal como se usa en la presente, el término "K_{on}" se refiere a la constante de asociación del anticuerpo con el antígeno.

Tal como se usa en la presente, el término "K_d" se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo/antígeno particular. $K_d = K_{off}/K_{on}$.

20 Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que ocurren naturalmente, que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto a que pueden ser sintetizados por un cultivo de hibridoma, esencialmente no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como perteneciente de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Tal como se mencionó antes, los anticuerpos monoclonales usados de conformidad con la presente invención se pueden obtener por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al., (1975) Nature 256: 495.

30 Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo policlonal" se refiere a un anticuerpo que es producido entre anticuerpos no idénticos o en la presencia de uno o más anticuerpos no idénticos. En general, los anticuerpos policlonales son producidos por un linfocito B en presencia de varios otros linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Usualmente, los anticuerpos policlonales son obtenidos directamente de un animal inmunizado.

35 Tal como se usa en la presente, el término, "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/livianas diferentes y dos sitios fijadores diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos por diversos métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión con fragmentos Fab'. Véase, p.ej., Songsivilai et al., (1990) Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny et al., (1992) J Immunol. 148:1547-1553. Además, los anticuerpos biespecíficos se pueden formar como "diacuerpos" (Holliger et al., (1993) PNAS USA 90:6444-6448) o como "Janusinas" (Traunecker et al., (1991) EMBO J. 10:3655-3659 y Traunecker et al., (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52).

45 Tal como se usa en la presente, "anticuerpos bifuncionales" o "inmunocitocinas" son proteínas de fusión de anticuerpo-citocinas que comprenden, en una terminal amino en dirección carboxiterminal, (i) el sitio de fijación del anticuerpo que comprende una región variable de inmunoglobulina capaz de fijar un antígeno de superficie celular sobre el tipo celular preseleccionado, un dominio CH1 de inmunoglobulina, un dominio CH2 de inmunoglobulina (opcionalmente un dominio CH3), y (ii) la citocina. Los métodos para preparar dichas inmunocitocinas bifuncionales se describen en Gillies et al. (1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. 89: 1428-1432; Gillies et al. (1998) J. Immunol. 160:6195-6203; y Patente de los Estados Unidos No. 5.650.150.

50 Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpos antiidiotípicos" o "antiidiotipos" se refiere a anticuerpos dirigidos contra la región de combinación del antígeno o región variable (denominada idiotipo) de otra molécula de anticuerpo. Tal como se describe en Jerne et al. (Jerne, N. K., (1974) Ann. Immunol. (París) 125c:373 y Jerne, N. K., et al., (1982) EMBO 1:234), la inmunización con una molécula de anticuerpo que expresa un paratopo (sitio de combinación del antígeno) para determinado antígeno (p.ej., un péptido MDL-1) produce un grupo de antianticuerpos, algunos de los cuales comparten una estructura complementaria del paratopo con el antígeno. A su vez, la inmunización con una subpoblación de los anticuerpos antiidiotípicos produce una subpoblación de anticuerpos o subconjuntos de células inmunes que reaccionan con el antígeno inicial.

60 Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo totalmente humano" se refiere a un anticuerpo que solo comprende secuencias de proteína inmunoglobulina humana. Un anticuerpo totalmente humano puede contener cadenas de hidratos de carbono murinos si es producido en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón. De modo similar, "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que solo comprende secuencias de inmunoglobulina de ratón.

Los anticuerpos de péptido anti-MDL-1 "humanizado" también están dentro del alcance de la presente invención. Tal como se usa en la presente, el término "humanizado" o "totalmente humanizado" se refiere a un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos provenientes de las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo progenitor, p.ej., un anticuerpo de ratón, injertado en un marco de anticuerpo humano. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p.ej., murino o de pollo) son inmunoglobulinas quiméricas que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos provenientes de una región determinante complementaria del receptor son reemplazados por residuos provenientes de una región determinante complementaria de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, pollo, rata o conejo, que tienen la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunas instancias, los residuos de marco Fv de la inmunoglobulina humana también son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos.

Tal como se usa en la presente, el término anticuerpo "parcialmente humanizado" o "quimérico" significa un anticuerpo que contiene regiones variables de cadenas pesada y liviana, p.ej., de origen murino, unido a regiones constantes de cadenas pesadas y livianas humanas.

Una alternativa a la humanización es el uso de bibliotecas de anticuerpos humanos dispuestos sobre bibliotecas de anticuerpos de fago o humano contenidos en ratones transgénicos, véase, p.ej., Vaughan et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:309-314; Barbas (1995) *Nature Med.* 1:837-839; de Haard et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18218-18230; McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Mendez et al. (1997) *Nature Genet.* 15:146-156; Hoogenboom y Chames (2000) *Immunol. Today* 21:371-377; Barbas et al. (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Kay et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:397-399.

Tal como se usa en la presente, el término "humano" se refiere a anticuerpos que contienen secuencias de aminoácidos que tienen 100 % origen humano, en donde los anticuerpos se pueden expresar, p.ej., en un huésped humano, animal, insecto, hongo, vegetal, bacteriano o viral (Baca et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Clark (2000) *Immunol. Today* 21:397-402).

La presente invención incluye un "anticuerpo quimérico", lo cual significa un anticuerpo que comprende una región variable de la presente invención fusionado o quimerizado con una región de anticuerpo (p.ej., región constante) de otra especie no humana (p.ej., ratón, caballo, conejo, perro, vaca, pollo). Estos anticuerpos se pueden usar para modular la expresión o la actividad de MDL-1 en la especie no humana.

Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo quimérico humano/ratón" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable de ratón (V_H y V_L) fusionada a una región constante humana.

Tal como se usa en la presente, el término fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" significa fragmento de anticuerpo que tiene los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Por lo general, el polipéptido sFv también comprende un ligador de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la fijación del antígeno. Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patentes de los Estados Unidos No. 5.476.786, 5.132.405 y 4.946.778) pueden ser adaptadas para producir anticuerpos específicos anti-MDL-1 de cadena única. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994).

Están descritos anticuerpos de cadena única, de dominio único y anticuerpos biespecíficos, véase, p.ej., Malecki et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290, Kostelney et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1547-1553; U.S. Pat. No. 5.932.448; 5.532.210; 6.129.914; 6.133.426; 4.946.778.

Tal como se usa en la presente, los términos "fragmentos Fv estabilizados por disulfuro" y "dsFv" se refieren a moléculas de anticuerpo que comprenden una cadena pesada variable (V_H) y una cadena liviana variable (V_L) unidos por un puente disulfuro.

Una "cantidad efectiva" de una composición de la invención puede ser una cantidad que mejore uno o más de los parámetros bien conocidos que caracterizan condiciones médicas causadas o mediadas por el receptor o MDL-1 o uno de sus fragmentos funcionales. Por "cantidad efectiva" también se entiende la cantidad o concentración de anticuerpo necesaria para fijar los antígenos blanco p.ej., MDL-1, expresados sobre los leucocitos infiltrantes para causar una reducción o prevención de la inflamación, la autoinmunidad o una lesión por reperusión.

"Inflamación" o "trastorno inflamatorio" tal como se usa en la presente es una respuesta inmunológica, p.ej., migración de leucocitos, ante una lesión o agente extraño, que no solo destruye al agente sino a los tejidos circundantes. La inflamación puede ocurrir, p.ej., en los aparatos digestivo, respiratorio, reproductor, excretor y musculoesquelético, y el sistema nervioso. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, sin limitaciones,

trastorno inflamatorio intestinal, enfermedad de Crohn, hiperreactividad pulmonar, nefritis, artritis (p.ej., osteoartritis), inflamación de la piel (p.ej., psoriasis, dermatitis atópica), etc.

La "autoinmunidad" o el "trastorno autoinmune" son condiciones caracterizadas por respuestas inmunes específicas humoral (células B) o mediada por células (células T) contra constituyentes de los tejidos propios del organismo (antígenos propios o autoantígenos). Los ejemplos de autoinmunidad incluyen, sin limitaciones, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, diabetes insulínica, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, artritis reumatoidea, síndrome de Goodpasture, esclerodermia, miastenia gravis, anemia perniciosa, etc.

Tal como se usa en la presente, el término "trastorno óseo" se refiere a una enfermedad caracterizada por pérdida ósea, es decir, una enfermedad, una condición, un trastorno o un síndrome que tiene por síntoma o patología una disminución de la masa o densidad ósea. Los ejemplos de enfermedades caracterizadas por pérdida ósea incluyen, sin limitaciones, osteólisis, incluso metástasis ósea, aflojamiento protésico aséptico, periodontitis, osteoporosis, enfermedad de Paget, enfermedad metastásica ósea y artritis reumatoidea. Dichos trastornos óseos incluyen los asociados con enfermedades autoinmunes tales como lupus y artritis reumatoidea. Se ha determinado que las mujeres con LES tienen valores de densidad T de mineral óseo significativamente inferiores a los de mujeres sin gran daño por enfermedad LES, con independencia del estado de uso previo de corticosteroides. Dichos trastornos óseos también incluyen condiciones asociadas con masa ósea reducida, incluso una condición en la cual el nivel de masa ósea es inferior al normal específico para la edad, según lo definido en los estándares por la Organización Mundial de la Salud "Evaluación de riesgos de fractura y su aplicación al estudio de osteoporosis posmenopáusica (1994). Reporte de un grupo de estudio. Series Técnicas de la Organización Mundial de la Salud 843". En las condiciones asociadas con masa ósea reducida se incluyen la osteoporosis primaria y secundaria.

También se incluyen la enfermedad periodontal, la pérdida de hueso alveolar, la pérdida ósea idiopática pososteotomía y de la infancia, así como las complicaciones a largo plazo de la osteoporosis, tales como curvatura de la columna vertebral, pérdida de estatura y cirugía protésica. Dichos trastornos óseos pueden afectar a quienes se presentan con masa ósea reducida, tales como los vertebrados, p.ej., mamíferos, en los que es sabido que tienen una probabilidad significativamente mayor que el promedio de desarrollar enfermedades tales como las antes descritas, incluso osteoporosis (p.ej., mujeres posmenopáusicas, varones mayores de 50 años). El trastorno se puede tratar por métodos que aumentan o mejoran la masa ósea, incluso la restauración ósea, el incremento de la tasa de curación de fracturas óseas, el reemplazo quirúrgico total con injerto óseo, el mejoramiento de la tasa de injertos óseos exitosos, la curación ósea posterior a la reconstrucción facial o la reconstrucción maxilar o la reconstrucción mandibular, el crecimiento protésico interno, la sinostosis vertebral o la extensión de los huesos largos. Los expertos en la técnica reconocerán que el término masa ósea en realidad se refiere a la masa ósea por unidad de superficie, en ocasiones (aunque no es estrictamente correcto) referido como densidad de mineral óseo.

Los ejemplos de trastornos óseos de la presente incluyen osteoporosis, tal como osteoporosis primaria o secundaria, e incluso osteoporosis inducida por glucocorticoides, una erosión ósea focal o por enfermedad tal como artritis reumatoidea e incluso erosiones de articulaciones marginales y erosiones óseas subcondrales (médula ósea), enfermedad de Paget, un defecto óseo, recambio óseo anormalmente incrementado, enfermedad periodontal, pérdida de dientes, osteólisis periprotésica, osteogénesis imperfecta, enfermedad metastásica ósea, hipercalcemia por malignidad, pérdida ósea idiopática de la infancia, pérdida ósea alveolar, fracturas óseas, osteopenia tal como osteopenia juxtaarticular, enfermedad ósea en mieloma múltiple y condiciones relacionadas tales como macroglobulinemia de Waldenstrom y/o gammapatía monoclonal. Los trastornos óseos de preferencia en la presente son enfermedad ósea en mieloma múltiple, macroglobulinemia y gammapatía monoclonal y osteoporosis, con mayor preferencia osteoporosis secundaria, y con mayor preferencia aún pérdida ósea durante la inflamación. Los trastornos óseos no asociados con una malignidad también se incluyen dentro del alcance de la invención.

"Osteoporosis secundaria" incluye la pérdida ósea durante la inflamación, la osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteoporosis inducida por hipertiroidismo, osteoporosis inducida por inmovilización, osteoporosis inducida por heparina y osteoporosis inducida por inmunosupresores en un vertebrado, p.ej., un mamífero (incluso un ser humano). Tal como se usa en la presente, el término "resorción ósea" se refiere a la pérdida de hueso no deseada, causada al menos en parte por la actividad de los osteoclastos.

"Osteólisis" se refiere a la pérdida ósea catastrófica, o a una consecuencia debilitante patológica de un espectro de estados de enfermedad que incluye artritis reumatoidea, metástasis ósea, aflojamiento protésico aséptico y periodontitis. La artritis reumatoidea (RA) es una enfermedad inflamatoria crónica que a menudo da por resultado una discapacidad a largo plazo y aumento de la mortalidad.

"Osteoprogenitora" se refiere a una célula precursora ósea diferenciada, derivada de una célula del estroma óseo.

"Odontoprogenitora" se refiere a una célula precursora ósea diferenciada, derivada del ligamento periodontal.

Descripción detallada de la invención

- Los términos "MDL-1", "lectina mieloide 1 ligada a DAP12", "lectina mieloide 1 asociada a DAP12", "DAP12", "DAP12", "Proteína de activación de DNAX, 12 kD" son bien conocidos en la técnica. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de DAP 12 y MDL-1 humanas y de ratón se describen en WO 99/06557. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de MDL-1 humano se definen por SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 de WO 99/06557, respectivamente. También están disponibles los depósitos GenBank® de la secuencia de ácido nucleico de MDL-1 humano (AR217548) y las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos MDL-1 de ratón (AR217549 y AAN21593, respectivamente).
- Una característica estructural de la proteína MDL-1 es el dominio extracelular, que es definido por los residuos de aminoácidos 26 a 188 de SEQ ID NO: 2 de una proteína MDL-1 humana, y los residuos de aminoácido 26 a 190 de SEQ ID NO: 4 de una proteína MDL-1 de ratón. La proteína MDL-1 soluble se puede fusionar con proteínas heterólogas, p.ej., la porción de anticuerpo Fc, o conjugar con porciones químicas, p.ej., PEG.
- Los polipéptidos MDL-1 solubles se pueden usar como agentes terapéuticos o diagnósticos similares en uso a los anticuerpos MDL-1 o sus fragmentos fijadores de antígeno. La expresión de MDL-1 en la superficie celular indica que esta molécula es un blanco atractivo para las estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos. Los anticuerpos MDL-1 pueden ser introducidos en un paciente de manera tal que el anticuerpo se fije a MDL-1.
- La presente invención se basa en el descubrimiento de que MDL-1 exacerba la destrucción ósea inflamatoria, mientras que los antagonistas de MDL-1 impiden la destrucción de este tipo de tejido.

Biología molecular

- De conformidad con la presente invención, se puede emplear biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la pericia en la técnica. Dichas técnicas se explican en su totalidad en la bibliografía. Véase, p.ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en la presente "Sambrook, *et al.*, 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).
- La presente invención incluye versiones recombinantes del anticuerpo MDL-1 o el fragmento fijador del antígeno de la invención.
- También se describe un ácido nucleico que codifica MDL-1, un MDL-1 soluble, un anticuerpo anti-MDL-1, una cadena pesada o liviana de anticuerpo anti-MDL-1, un región variable de cadena pesada o liviana de anticuerpo anti-MDL-1, una región constante de cadena pesada o liviana de anticuerpo anti-MDL-1 o CDR de anticuerpo anti-MDL-1 (p.ej., CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3), que se pueden amplificar por PCR.
- La secuencia de cualquier ácido nucleico (p.ej., un ácido nucleico que codifica un gen MDL-1 o un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-MDL-1 o uno de sus fragmentos o porciones) puede ser secuenciada por cualquier método conocido en la técnica (p.ej., secuenciación química o secuenciación enzimática). La "secuenciación química" de ADN puede denotar métodos tales como el de Maxam y Gilbert (1977) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560), en el cual el ADN es escindido aleatoriamente mediante el uso de reacciones específicas para cada base individual. La "secuenciación enzimática" de ADN puede denotar métodos tales como el de Sanger (Sanger *et al.*, (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463).
- Los ácidos nucleicos de la presente pueden estar flanqueados por secuencias reguladores naturales (control de expresión), o pueden ser asociados con secuencias heterólogas, incluso promotores, sitios internos de entrada de ribosomas (IRES) y otras secuencias de sitios de fijación de ribosomas, mejoradores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificadoras 5' y 3', y similares.
- Los promotores que se pueden usar para controlar la expresión génica incluyen, sin limitaciones, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Patentes de los Estados Unidos No. 5.385.839 y 5.168.062), la región promotora temprana SV40 (Benoist *et al.*, (1981) *Nature* 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus de sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, (1980) *Cell* 22:787-797), el promotor de timidinacina de herpes (Wagner *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, (1982) *Nature* 296:39-42); vectores de expresión procarionte tales como el promotor de β -lactamasa (Villa-Komaroff *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731), o el promotor tac (DeBoer *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25); véase también "Proteínas útiles de bacterias recombinantes" en *Scientific American* (1980) 242:74-94; y elementos promotores de levaduras u otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor ADC (alcoholdehidrogenasa), el promotor PGK (fosfoglicerolcincinasa) o el promotor fosfatasa alcalina.

Una secuencia codificadora está "bajo el control de", "asociada funcionalmente con" o "asociada operativamente con" secuencias control de la transcripción y la traducción en una célula cuando las secuencias dirigen la transcripción mediada por ARN polimerasa de la secuencia codificadora en ARN, de preferencia mARN, que entonces puede ser escindida trans-ARN (si contiene intrones) y, opcionalmente, traducida en una proteína codificada por la secuencia codificadora.

También se incluyen en la presente descripción los ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de nucleótidos y polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que son al menos 70 % idénticas, al menos 80 % idénticas, al menos 90 % idénticas p.ej., 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, y al menos 95 % idénticas p.ej., 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, a las secuencias de referencia de los nucleótidos y aminoácidos de la Tabla 1, cuando se realiza una comparación mediante un algoritmo BLAST, en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar la mayor concordancia entre las respectivas secuencias sobre la longitud total de las respectivas secuencias de referencia. También se incluyen en la presente descripción los polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos que son al menos 70 % similar, al menos 80 % similar, al menos 90 % similar p.ej., 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, y al menos 95 % similar p.ej., 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, a las secuencias de aminoácidos de referencia de la Tabla 1 p.ej., SEQ ID Nos: 2 y 4, cuando se realiza una comparación mediante un algoritmo BLAST, en donde los parámetros del algoritmo se seleccionan para dar la mayor concordancia entre las respectivas secuencias sobre la longitud total de las respectivas secuencias de referencia.

La identidad de secuencia se refiere a concordancias exactas entre los nucleótidos o aminoácidos de dos secuencias que se comparan. Similitud de secuencia se refiere a concordancias exactas entre los aminoácidos de dos polipéptidos que se comparan, además de concordancias entre aminoácidos bioquímicamente relacionados, no idénticos. Los aminoácidos bioquímicamente relacionados que comparten propiedades similares y pueden ser intercambiados se analizaron con anterioridad.

La proteína MDL-1 soluble comprende el dominio extracelular de MDL-1. Además, los fragmentos del dominio extracelular también proveen formas solubles de la proteína MDL-1. Los fragmentos se pueden preparar mediante el uso de técnicas conocidas para aislar una porción deseada de la región extracelular.

Se pueden usar técnicas convencionales de biología molecular para producir proteínas quiméricas con MDL-1 fusionado con un polipéptido heterólogo enzimáticamente inactivo (p.ej., una región Fc lítica o no lítica de IgG). De preferencia, la proteína tiene un peso molecular de al menos 10 kD; una carga neutra neta a pH 6,8; una estructura terciaria globular; y es de origen humano. Cuando el polipéptido enzimáticamente inactivo es IgG, de preferencia la porción IgG está glucosilada. Si se desea, el polipéptido enzimáticamente inactivo puede incluir una región bisagra de IgG ubicada de manera tal que la proteína quimérica tiene MDL-1 unido a una región bisagra de IgG, con la región bisagra unida a un polipéptido incrementador de longevidad. En consecuencia, la región bisagra puede servir como espaciador entre la citocina y el polipéptido incrementador de longevidad. Una persona experta en biología molecular puede fácilmente producir dichas moléculas a partir de un hibridoma secretor de IgG2a (p.ej., HB129) u otros sistemas de células eucariontes o baculovirus. Como alternativa del uso de una región bisagra de IgG se puede usar un espaciador de polipéptido flexible, tal como se define en la presente. Mediante el uso de técnicas de biología molecular convencional, dicho polipéptido se puede insertar entre MDL-1 y el polipéptido incrementador de longevidad.

Cuando la proteína heteróloga incluye una región Fc, se puede mutar la región Fc, si se desea, a fin de inhibir su capacidad para fijar el complemento y fijar el receptor Fc con gran afinidad. Para Fc de IgG murino, la sustitución por residuos Ala en Glu 318, Lys 320 y Lys 322 produce una proteína incapaz de dirigir ADCC. La sustitución por Glu en Leu 235 inhibe la capacidad de la proteína para fijar el receptor Fc con gran afinidad. También se conocen mutaciones apropiadas para IgG humana (véase, p.ej., Morrison et al., 1994, *The Immunologist* 2: 119-124 y Brekke et al., 1994, *The Immunologist* 2: 125). También se pueden usar otras mutaciones para inhibir estas actividades de la proteína, y se pueden usar métodos reconocidos en la técnica para estudiar la capacidad de la proteína para fijar el complemento o fijar el receptor Fc. Otros polipéptidos heterólogos útiles incluyen albúmina (p.ej., albúmina sérica humana), transferrina, enzimas tales como t-PA que ha sido inactivado por mutaciones, y otras proteínas con una vida media circulante prolongada y sin actividad enzimática en humanos.

Las proteínas quiméricas se pueden sintetizar (p.ej., en células de mamífero) mediante métodos convencionales para la expresión de proteína mediante el uso de tecnología de ADN recombinante. Dado que muchos de los polipéptidos usados para crear las proteínas quiméricas han sido purificados previamente, muchos de los métodos de purificación de proteínas descritos previamente deberían ser útiles, junto con otros métodos convencionales, para purificar las proteínas quiméricas. Si se desea, la proteína quimérica se puede purificar de acuerdo con protocolos estándar con anticuerpos dirigidos contra la citocina. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína enzimáticamente inactiva también son útiles para purificar la proteína quimérica mediante técnicas convencionales de inmunoafinidad. Si se desea, la actividad de la proteína quimérica se puede analizar mediante métodos que son de uso común para estudiar la actividad de la proteína sola. No es necesario que la actividad de la proteína quimérica sea idéntica a la actividad de la proteína sola.

La presente descripción también incluye fusiones que incluyen los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención y una segunda porción de polipéptido o polinucleótido, al que se puede referir como "rótulo". Los polipéptidos fusionados de la invención pueden ser construidos convenientemente, por ejemplo, por inserción de un polinucleótido de la invención o su fragmento en un vector de expresión tal como se describió antes. Las fusiones de la invención pueden incluir rótulos que facilitan la purificación o la detección. Dichos rótulos incluyen rótulos de glutation-S-transferasa (GST), hexahistidina (His6), rótulos de proteína fijadora de maltosa (MBP), rótulos de hemaglutinina (HA), rótulos de proteína fijadora de celulosa (CBP) y rótulos myc. Las etiquetas o los rótulos detectables tales como ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{68}Ga , ^{18}F , ^{125}I , ^{131}I , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{76}Br , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{111}In y ^{68}Ga también se pueden usar para rotular los polipéptidos de la invención. Los métodos para construir y usar dichas fusiones son muy convencionales y bien conocidos en la técnica.

Las modificaciones (p.ej., modificaciones postraducción) que tienen lugar en un polipéptido a menudo serán función de la forma de preparación. Para los polipéptidos preparados por expresión de un gen clonado en un huésped, por ejemplo, la naturaleza y el grado de las modificaciones estarán determinados en gran medida por la capacidad de modificación postraducción de la célula huésped y de las señales de modificación presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por ejemplo, como es bien sabido, a menudo la glucosilación no ocurre en huéspedes bacterianos tales como *E. coli*. En consecuencia, cuando se desea la glucosilación, se puede expresar el polipéptido en un huésped glucosilante, generalmente una célula eucarionte. Las células de insecto a menudo portan glucosilaciones postraducción que son similares a las de las células de mamífero. Por esta razón, los sistemas de expresión de las células de insectos se han desarrollado para expresar eficientemente las proteínas de mamífero que tienen patrones nativos de glucosilación. Como alternativa, las enzimas de glucosilación se pueden usar para eliminar los hidratos de carbono adosados durante la producción en sistemas de expresión eucariontes.

Se pueden preparar análogos de los péptidos MDL-1 mediante síntesis química o mediante el uso de mutagénesis dirigida a sitio, Gillman et al., (1979) Gene 8:81; Roberts et al., (1987) Nature, 328:731 o Innis (Ed.), 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Nueva York, NY o el método de reacción en cadena de polimerasas PCR; Saiki et al., (1988) Science 239:487, según se ejemplifica en Daugherty et al., (1991) (Nucleic Acids Res. 19:2471) para modificar los ácidos nucleicos que codifican los péptidos. Se considera el agregado de rótulos de epitopo para la purificación o detección de productos recombinantes.

Aún otros análogos se preparan mediante el uso de agentes conocidos en la técnica por su utilidad en la formación de enlaces cruzados de proteínas mediante grupos reactivos laterales. Los sitios preferidos de derivación con agentes formadores de enlaces cruzados son los grupos amino o carboxilo libres, las porciones de hidratos de carbono y los residuos de cisteína.

Purificación de proteínas

En general, los péptidos de la invención se pueden producir mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica el polipéptido en una célula huésped, que es cultivado en un medio de cultivo (p.ej., medio de cultivo líquido tal como caldo Luria). Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser parte de un vector (p.ej., un plásmido) que está presente en la célula huésped. Después de la expresión, los péptidos de la invención se pueden aislar de las células cultivadas. Los péptidos de la presente invención pueden ser purificados por métodos estándar, incluyendo, sin limitaciones, precipitación por sal o alcohol, cromatografía de afinidad (p.ej., usado en conjunción con un péptido con rótulo de purificación tal como se analizó antes), electroforesis en gel con disco de preparación, focalización isoelectrica, cromatografía líquida con alta presión (HPLC), HPLC de fase inversa, filtración en gel, intercambio catiónico y aniónico y cromatografía de partición, y distribución de contracorriente. Dichos métodos de purificación son muy bien conocidos en la técnica y se describen, p.ej., en "Guide to Protein Purification", Methods in Enzymology, Vol. 182, M. Deutscher, Ed., 1990, Academic Press, Nueva York, NY.

Estructura del anticuerpo

En general, se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en donde cada par tiene una cadena "liviana" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción aminoterminal de cada cadena puede incluir una región variable de unos 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La porción carboxiterminal de cada cadena puede definir una región constante responsable principalmente de la función efectora. En general, las cadenas livianas humanas se clasifican como cadenas livianas kappa y lambda. Además, las cadenas pesadas humanas generalmente se clasifican en mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de unos 10 aminoácidos más. Véase en general, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2° ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporada por referencia en su totalidad para todo fin).

Las regiones variables de cada par de cadenas liviana/pesada pueden formar el sitio de fijación del anticuerpo. Por lo tanto, en general, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de fijación. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de fijación, en general, son el mismo.

5 Normalmente, todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Por lo general, los CDR de las dos cadenas de cada par están alineados por las regiones marco, lo cual permite la fijación a un epitopo específico. En general, desde el N-terminal al C-terminal, las cadenas liviana y
10 pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio por lo general es de conformidad con las definiciones de las Secuencias de proteínas de interés inmunológico, Kabat et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5° ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 o Chothia et al., (1989) Nature 342:878-883.

15 Moléculas de anticuerpo

Las moléculas de anticuerpo anti-MDL-1 de la invención de preferencia reconocen MDL-1 humano. Por ejemplo, el polipéptido expresado por los genes que comprenden la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el polipéptido MDL-1 soluble que es definido por los residuos de aminoácidos 26 a 188 de SEQ ID NO: 2 de una
20 proteína MDL-1 humana. No obstante, la presente invención incluye moléculas de anticuerpo que reconocen MDL-1 de ratón y MDL-1 de otras especies, de preferencia mamíferos (p.ej., rata, conejo, oveja o perro). Por ejemplo, el polipéptido expresado por los genes que comprenden la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, el polipéptido MDL-1 soluble que es definido por los residuos de aminoácidos 26 a 190 de SEQ ID NO: 4 de una proteína MDL-1 murina. La presente invención también incluye anticuerpos anti-MDL-1 o sus fragmentos que
25 forman complejos con MDL-1 o cualquiera de sus fragmentos o con cualquier célula que exprese MDL-1 o cualquier porción o sus fragmentos sobre la superficie celular. Tales complejos pueden ser preparados al poner en contacto el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo con MDL-1 o el fragmento de MDL-1.

En una forma de realización, se generan anticuerpos monoclonales totalmente humanos dirigidos contra MDL-1, mediante el uso de ratones transgénicos vehículos de partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de
30 ratón. Estos ratones transgénicos, a los que se puede hacer referencia en la presente como ratones "HuMab", contienen un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de cadenas pesadas (μ y γ) y livianas κ no organizadas de inmunoglobulina humana, junto con mutaciones dirigidas que inactivan el locus endógeno de cadenas μ y κ (Lonberg, N., et al., (1994) Nature 368(6474):856-859). Estos anticuerpos también se refieren como anticuerpos totalmente humanos. En consecuencia, los ratones exhiben expresión reducida de IgM de ratón o κ , y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadenas pesadas y livianas humanas introducidas sufren cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de gran afinidad (Lonberg, N., et al., (1994), supra; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg et al., (1995) Intern.Rev. Immunol. 13:65-93, y Harding et al., (1995) Ann. N. Y Acad. Sci 764:536-546).
40 La preparación de ratones HuMab es de conocimiento común en la técnica y se describe, por ejemplo, en Taylor et al., (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al., (1993) International Immunology 5:647-656; Tuailon et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724; Choi et al., (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen et al., (1993) EMBO J. 12:821-830; Tuailon et al., (1994) J Immunol. 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474):856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor et al., (1994) International Immunology 6:579-591; Lonberg et al., (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93; Harding et al., (1995) Ann. N.Y Acad. Sci 764:536-546; Fishwild et al., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 y Harding et al., (1995) Annals NY Acad. Sci. 764:536-546; donde el contenido de todos ellos se incorpora así a la presente por referencia en su totalidad. Véase también, Patentes de los Estados Unidos No. 5.545.806; 5. 569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874. 299; 5.770.429 y 5.545.807; y la Publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/12227; WO 92/22645 y WO 92/03918.
50

Para generar anticuerpos monoclonales para MDL-1 totalmente humanos, los ratones HuMab pueden ser inmunizados con un polipéptido MDL-1 antigénico tal como se describe en Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474):856-859; Fishwild et al., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851 y WO 98/24884. De preferencia, los
55 ratones tendrán 6-16 semanas de edad a la primera inmunización. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada de MDL-1 para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal. Los ratones también pueden ser inmunizados con células enteras transformadas o transfectadas en forma estable con un gen MDL-1.

En general, los ratones HuMab transgénicos responden bien cuando son inmunizados inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en coadyuvante de Freund completo, seguido semana de por medio por
60 inmunizaciones IP (usualmente hasta un total de 6) con antígeno en coadyuvante de Freund incompleto. Los ratones pueden ser inmunizados primero con células que expresan MDL-1, después con un fragmento de MDL-1 soluble y reciben continuamente inmunizaciones alternadas con los dos antígenos. La respuesta inmune es monitoreada durante el curso del protocolo de inmunización con muestras plasmáticas obtenidas por sangrado retroorbital. El
65 plasma se analiza para la presencia de anticuerpos anti-MDL-1, por ejemplo por ELISA, y se usan los ratones con títulos de inmunoglobulina suficientes para las fusiones. Los ratones pueden ser reforzados por vía intravenosa con

antígeno 3 días antes de ser sacrificados y de ser retirados los bazos. Es de esperar que se requiera efectuar 2-3 fusiones para cada antígeno. Varios ratones se inmunizan para cada antígeno. Por ejemplo, se puede inmunizar un total de doce ratones HuMAb de las cepas HC07 y HC012.

5 Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales anti-MDL-1 pueden ser producidos por métodos de conocimiento común en la técnica. Estos métodos incluyen, sin limitaciones, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler, et al., (1975) (Nature 256:495-497), así como la técnica de trioma (Hering et al., (1988) Biomed. Biochim. Acta. 47:211-216 y Hagiwara et al., (1993) Hum. Antibod. Hibridomas 4:15), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., (1983) Immunology Today 4:72 y Cote et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 80:2026-2030), y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985). De preferencia, los esplenocitos de ratón se aíslan y fusionan con PEG a una línea celular de mieloma de ratón sobre la base de protocolos estándar. Los hibridomas resultantes pueden entonces ser analizados respecto de la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, suspensiones de células únicas de linfocitos esplénicos provenientes de ratones inmunizados se pueden fusionar hasta un sexto de la cantidad de P3X63-Ag8.653 células no secretoras de mieloma de ratón (ATCC, CRL 1580) con 50 % de PEG. Las células se plaquean a aproximadamente 2×10^5 células/mL en una placa de microtitulación de base plana, seguido de dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene 20 % de Clone Serum fetal, 18 % de medio condicionado "653", 5 % de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, L-glutamina 1 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 50 mg/mL, gentamicina 50 mg/m y IX HAT (Sigma; se agrega HAT 24 horas después de la fusión). Después de dos semanas, las células se cultivan en un medio en el cual HAT es reemplazado por HT. Entonces se analizan las cavidades individuales por ELISA para detectar anticuerpos IgG monoclonales humanos anti-MDL-1. Una vez que aparece un crecimiento extenso de hibridoma, generalmente se observa el medio después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden ser replaqueados, analizados nuevamente, y si aún son positivos para IgG humano, anticuerpos monoclonales anti-MDL-1, se pueden subclonar al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar entonces *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para su caracterización.

30 Las moléculas de anticuerpo anti-MDL-1 de la presente invención también se pueden producir por recombinación (p.ej., en un sistema de expresión de *E.coli*/T7 como se analizó con anterioridad). En la presente forma de realización, se pueden insertar los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de anticuerpo de la invención (p.ej., V_H o V_L) en un plásmido sobre base pET y expresar en el sistema *E.coli*/T7. Existen varios métodos por los cuales producir anticuerpos recombinantes que son conocidos en la técnica. Un ejemplo de un método para la producción recombinante de anticuerpos se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4.816.567 que se incorpora a la presente por referencia. Puede realizarse la transformación por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrán, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótidos en liposomas, inyección biolística y microinyección directa del ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser introducidas en las células de mamífero mediante vectores virales. Los métodos de transformación de células son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos No. 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461 y 4.959.455.

45 Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes de la expresión son bien conocidos en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, *inter alia*, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p.ej., Hep G2), células A549, células 3T3, y numerosas otras líneas celulares. Las células huésped de mamífero incluyen células humanas, de ratón, rata, perro, mono, cerdo, cabra, bovino, caballo y hámster. Las líneas celulares de particular preferencia se seleccionan por determinación de cuáles líneas celulares presentan niveles elevados de expresión. Otras líneas celulares que se pueden usar son líneas celulares de insectos, tales como células Sf9, células de anfibios, células bacterianas, células vegetales y células fúngicas. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes codificadores de la cadena pesada o el fragmento fijador de antígeno correspondiente, y de la cadena liviana y/o el fragmento fijador de antígeno correspondiente en las células huésped de mamífero, se producen los anticuerpos por cultivo de las células huésped durante un periodo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, con mayor preferencia, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped.

60 Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo mediante el uso de métodos estándar de purificación de proteínas. Además, se puede mejorar la expresión de los anticuerpos de la invención (u otras de sus porciones) de las líneas celulares de producción mediante diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión génica de la glutamintasintetasa (el sistema GS) es un abordaje común para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS es analizado en todo o en parte en conexión con las Patentes Europeas No. 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la Solicitud de Patente Europea No. 89303964.4.

65

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferente glucosilación entre sí. No obstante, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácidos nucleicos provistos en la presente, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en la presente son parte de la invención inmediata, con independencia de la glucosilación de los anticuerpos.

5 Los fragmentos de anticuerpo, de preferencia los fragmentos de anticuerpo fijadores de antígeno, están cubiertos por el alcance de la presente invención que también incluye fragmentos F(ab)₂ que pueden ser producidos por escisión enzimática de una IgG, por ejemplo, por pepsina. Los fragmentos Fab pueden ser producidos, por ejemplo, por reducción de F(ab)₂ con ditiotretitol o mercaptoetilamina. Un fragmento Fab es una cadena V_L-C_L adosada a una
10 cadena V_H-C_{H1} mediante un puente disulfuro. Un fragmento F(ab)₂ está formado por dos fragmentos Fab que, a su vez, están adosados mediante dos puentes disulfuro. La porción Fab de una molécula F(ab)₂ incluye una porción de la región F_c entre la cual se ubican los puentes disulfuro.

Como es bien sabido, Fv, el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y fijación del antígeno, consiste de dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena liviana (V_H-V_L) en asociación no covalente. En esta configuración que corresponde a la que se encuentra en anticuerpos nativos, las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de fijación del antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, los seis CDR confieren especificidad de fijación de antígeno al anticuerpo. Los marcos (FR) que flanquean los CDR presentan una estructura terciaria que
15 está esencialmente conservada en las inmunoglobulinas nativas de especies tan diversas como los humanos y el ratón. Estos FR sirven para mantener los CDR en la orientación apropiada. Los dominios constantes no son requeridos para la función de fijación, pero pueden contribuir en la estabilización de la interacción V_H-V_L. Incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y fijar el antígeno, si bien por lo general con menor afinidad que un sitio de fijación completo (Dolortier, Biochem. 11 (1972), 1327-1337). En consecuencia, dicho dominio del sitio de fijación del
20 constructo del anticuerpo tal como se define y se describe en la presente invención puede ser un par de dominios V_H-V_L, V_H - V_H o V_L - V_L de diferentes inmunoglobulinas. El orden de los dominios V_H y V_L dentro de la cadena del polipéptido no es decisiva para la presente invención, el orden de los dominios presentados con anterioridad pueden ser revertidos, por lo general sin ninguna pérdida de función. No obstante, es importante que los dominios V_H y V_L se dispongan de manera tal que el sitio de fijación del antígeno se pliegue correctamente. Un fragmento Fv es una
25 región V_L o V_H.

Según las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases. Hay al menos cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden ser divididas a su vez en subclases (isotipos), p.ej. IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2.
35

Las moléculas de anticuerpo anti-MDL-1 de la invención también pueden ser conjugadas a un resto químico. El resto químico puede ser, *inter alia*, un polímero, un radionucleido o un factor citotóxico. De preferencia, el resto químico es un polímero que incrementa la vida media de la molécula de anticuerpo en el organismo de un sujeto. Los polímeros adecuados incluyen, sin limitaciones, polietilenglicol (PEG) (p.ej., PEG con un peso molecular de 2kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12kDa, 20 kDa, 30kDa o 40kDa), dextrán y monometoxipolietilenglicol (mPEG). Lee et al., (1999) (Bioconj. Chem. 10:973-981) describe anticuerpos monocatenarios conjugados con PEG. Wen et al., (2001) (Bioconj. Chem. 12:545-553) describe anticuerpos conjugados con PEG que se adosan a un quelante radiometálico (ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)).
40
45

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención también pueden ser conjugados con rótulos tales como ⁹⁹Tc, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, ¹³¹I, ¹¹C, ¹⁵O, ¹³N, ¹⁸F, ³⁵S, ⁵¹Cr, ⁵⁷To, ²²⁶Ra, ⁶⁰Co, ⁵⁹Fe, ⁵⁷Se, ¹⁵²Eu, ⁶⁷Cu, ²¹⁷Pb, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ²³⁴Th y ⁴⁰K, ¹⁵⁷Gd, ⁵⁵Mn, ⁵²Tr y ⁵⁶Fe.
50

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención también pueden ser conjugados con rótulos fluorescentes o quimioluminiscentes, incluso fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaladehído, fluorescamina, ¹⁵²Eu, dansil, umbeliferona, luciferina, rótulo de luminal, rótulo de isoluminal, rótulo de un éster aromático de acridinio, rótulo de imidazol, rótulo de una sal de acridimio, rótulo de un éster de oxalato, rótulo de una ecurina, 2,3-dihidroftalazindionas, biotina/avidina, rótulos de spin y radicales libres estables.
55

Las moléculas de anticuerpo también se pueden conjugar con un factor citotóxico tal como toxina de difteria, cadena A de exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfarsarcina, proteínas y compuestos (p.ej., ácidos grasos) de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas PAPI, PAPH y PAP-S de *Phytoiaccia american*, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina.
60

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar las moléculas de anticuerpo de la invención a las diversas porciones, incluso los métodos descritos por Hunter et al., (1962) Nature 144:945; David et
65

al., (1974) *Biochemistry* 13:1014; Dolor et al., (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; y Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Los métodos para conjugar anticuerpos son convencionales y muy bien conocidos en la técnica.

5 Los fragmentos antigénicos (es decir, inmunogénicos) de los péptidos MDL-1 de la invención están dentro del alcance de la presente invención. Los fragmentos antigénicos se pueden unir a otros materiales, tales como polipéptidos fusionados o unidos por covalencia, para ser usados como inmunógenos. Los péptidos antigénicos pueden ser de utilidad para preparar moléculas de anticuerpos que reconocen MDL-1 o cualquiera de sus fragmentos. Un antígeno y sus fragmentos se pueden fusionar o unir por covalencia a diversos inmunógenos, tales como hemocianina de lapa, albúmina sérica bovina u ovalbúmina (Coligan et al. (1994) *Current Protocols en Immunol.*, Vol. 2, 9.3-9.4, John Wiley and Sons, Nueva York, NY). Los péptidos de antigenicidad adecuada pueden ser seleccionados del polipéptido blanco, mediante un algoritmo, véase, p.ej., Parker et al. (1986) *Biochemistry* 25:5425-5432; Jameson y Wolf (1988) *Cabios* 4:181-186; Hopp y Woods (1983) *Mol. Immunol.* 20:483-489.

15 Aunque no siempre es necesario, cuando se usan los péptidos MDL-1 como antígenos para inducir la producción de anticuerpo en un huésped inmunológicamente competente, de preferencia primero se hacen más inmunogénicos los fragmentos antigénicos más pequeños por enlaces cruzados o concatenación, o por acoplamiento a una molécula vehículoa inmunogénica (es decir, una macromolécula que tiene la propiedad de inducir en forma independiente una respuesta inmunológica en un huésped animal, tal como la toxina de difteria o el tétano). Pueden requerirse enlaces cruzados o conjugación a una molécula vehículoa porque en ocasiones los pequeños fragmentos de polipéptido actúan como haptenos (moléculas capaces de unirse específicamente a un anticuerpo pero incapaces de inducir la producción de anticuerpo, es decir, no son inmunogénicos). La conjugación de tales fragmentos a una molécula vehículoa inmunogénica los hace más inmunogénicos a través de lo que se conoce comúnmente como "efecto vehículo".

25 Las moléculas vehículos incluyen, p.ej., proteínas y compuestos poliméricos naturales o sintéticos tales como polipéptidos, polisacáridos, lipopolisacáridos, etc. Se prefieren especialmente las moléculas vehículoas de proteínas, incluso, sin limitaciones, la hemocianina de lapa y las proteínas séricas de mamíferos tales como la gammaglobulina humana o bovina, la albúmina sérica humana, bovina o de conejo, o metilados u otros derivados de tales proteínas. Otros vehículos de proteína serán aparentes para los expertos en la técnica. De preferencia, el vehículo de proteína será extraño al huésped animal en el cual se pretenden generar los anticuerpos contra los fragmentos.

30 Se puede lograr el acoplamiento covalente a la molécula vehículoa mediante métodos bien conocidos en la técnica; la elección exacta de cuál estará dictado por la naturaleza de la molécula vehículoa usada. Cuando la molécula vehículoa inmunogénica es una proteína, los fragmentos de la invención se pueden acoplar, p.ej., mediante carbodiimidias hidrosolubles tales como dicitohexilcarbodiimida o glutaraldehído.

40 Los agentes de acople, tales como los vistos, también se pueden usar para formar enlaces cruzados entre los fragmentos sin usar una molécula vehículoa separada. Tales enlaces cruzados para formar agregados también puede incrementar la inmunogenicidad. También se puede incrementar la inmunogenicidad por el uso de coadyuvantes conocidos, solos o en combinación con acople o agregación.

45 Los coadyuvantes para la vacunación de animales incluyen, sin limitaciones, Coadyuvante 65 (que contiene aceite de maní, monooleato de manida y monoestearato de aluminio); coadyuvante de Freund completo o incompleto; geles minerales tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y alúmina; agentes tensioactivos tales como hexadecilamina, octadecilamina, lisolectina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroximetil)propandiamina, metoxihexadecilglicerol y polioles plurónicos; polianiones tales como pirano, sulfato de dextrán, poli-IC, ácido poliacrílico y carbopol; péptidos tales como muramildipéptido, dimetilglicina y tuftsina; y emulsiones oleosas. Los polipéptidos también se pueden administrar después de la incorporación en liposomas u otros microvehículos.

50 La información concerniente a coadyuvantes y diversos aspectos de inmnoensayos se describen, p.ej., en la serie de P. Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, 3^o Edición, 1987, Elsevier, Nueva York. Otras referencias de utilidad que cubren los métodos para preparar antisueros policlonales incluyen *Microbiology*, 1969, Hoeber Medical Division, Harper y Row; Landsteiner, *Specificity of Serological Reacciones*, 1962, Dover Publications, Nueva York, y Williams, et al., *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Vol. 1, 1967, Academic Press, Nueva York.

60 Las "moléculas de anticuerpo" anti-MDL-1 de la invención incluyen, pero de ninguna manera están limitadas, los anticuerpos anti-MDL-1 (p.ej., anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos antiidiotípicos) y sus fragmentos, de preferencia fragmentos fijadores de antígeno, tales como fragmentos Fab de anticuerpo, fragmentos F(ab)₂ de anticuerpo, fragmentos Fv de anticuerpo (p.ej., V_H o V_L), fragmentos Fv de anticuerpo monocatenarios y fragmentos dsFv de anticuerpo. Además, las moléculas de anticuerpo de la invención pueden ser anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos de ratón, anticuerpos de conejo, anticuerpos de pollo, anticuerpos quiméricos de humano/ratón o anticuerpos humanizados.

65

Las moléculas de anticuerpo anti-MDL-1 de la invención, de preferencia reconocen los péptidos MDL-1 de humano o ratón de la invención; no obstante, la presente invención incluye las moléculas de anticuerpo que reconocen péptidos MDL-1 provenientes de diferentes especies, de preferencia mamíferos (p.ej., cerdo, rata, conejo, oveja o perro).

5 La presente invención también incluye complejos que comprenden los péptidos MDL-1 de la invención y una o más moléculas de anticuerpo, p.ej., anticuerpos bifuncionales. Tales complejos se pueden preparar por simple contacto de las moléculas de anticuerpo con su péptido cognado.

10 Se pueden usar diversos métodos para preparar las moléculas de anticuerpo de la invención. En formas de realización de preferencia, los anticuerpos de la invención se producen por métodos que son similares a los escritos en las Patentes de los Estados Unidos No. 5.625.126; 5.877.397; 6.255.458; 6.023.010 y 5.874.299. Las células de hibridoma que producen anticuerpos peptídicos monoclonales anti-MDL-1 totalmente humanos pueden entonces ser producidas por métodos que son de conocimiento común en la técnica. Estos métodos incluyen, sin limitaciones, la
15 técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler et al., (1975) (*Nature* 256:495-497), así como la técnica de trioma (Hering et al., (1988) *Biomed. Biochim. Acta.* 47:211-216 y Hagiwara et al., (1993) *Hum. Antibod. Hybridomas* 4:15), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., (1983) *Immunology Today* 4:72 y Cote et al., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030), y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985). Nuevamente, se puede usar ELISA
20 para determinar si las células de hibridoma expresan anticuerpos peptídicos anti-MDL-1.

La purificación del antígeno no es necesaria para la generación de anticuerpos. La inmunización se puede efectuar por inmunización de vector de ADN, véase, p.ej., Wang, et al. (1997) *Virology* 228:278-284. Alternativamente, se
25 pueden inmunizar los animales con células vehículoas del antígeno de interés. Entonces se aíslan esplenocitos de los animales inmunizados, y los esplenocitos se pueden fusionar con una línea celular de mieloma para producir un hibridoma (Meyaard et al. (1997) *Immunity* 7:283-290; Wright et al. (2000) *Immunity* 13:233-242; Preston et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27:1911-1918). Los hibridomas resultantes pueden ser estudiados respecto de la producción del anticuerpo deseado mediante ensayos funcionales o ensayos biológicos, es decir, ensayos no dependientes de la posesión del antígeno purificado. La inmunización con células puede demostrar ser superior para la generación de
30 anticuerpos que la inmunización con antígeno purificado (Kaithamana et al. (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Las propiedades de fijación del anticuerpo con el antígeno y del ligando con el receptor se pueden medir, p.ej., por resonancia de plasmon de superficie (Karlsson et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 145:229-240; Neri et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:1271-1275; Jonsson et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627) o por ELISA de competencia (Friguet et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 77:305-319; Hubble (1997) *Immunol. Today* 18:305-306). Se pueden usar los anticuerpos para purificación por afinidad y aislar el antígeno blanco del anticuerpo y las proteínas ligadas asociadas, véase, p.ej., Wilchek et al. (1984) *Meth. Enzymol.* 104:3-55.

Los anticuerpos que se fijan específicamente a las variantes de MDL-1, en donde las variantes tienen sustancialmente las mismas secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos que las citadas en la presente, pero con sustituciones que no afectan sustancialmente los aspectos funcionales de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, se incluyen en la definición de los métodos contemplados. Las variantes con truncaciones, eliminaciones, adiciones y sustituciones de regiones que no cambian sustancialmente las funciones biológicas de estos ácidos nucleicos y polipéptidos se incluyen en la definición de los métodos contemplados.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de fijación para al menos dos epitopos diferentes. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos se pueden fijar a dos epitopos diferentes de MDL-1. Alternativamente, los anticuerpos biespecíficos de MDL-1 se pueden fijar a otro antígeno, p.ej., DC-SIGN, CD20, RANK-L, etc.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas-cadenas livianas de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein et al. *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución aleatoria de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina, estos
55 hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza por etapas de cromatografía por afinidad, es bastante laboriosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se describen en WO 93/08829, y en Traunecker et al. *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un abordaje diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de fijación deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a las secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. De preferencia, la fusión se hace con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena liviana, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea la cadena liviana de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión

separados, y son cotransfectados en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en las formas de realización, cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proveen rendimientos óptimos. No obstante, es posible insertar las secuencias codificadoras para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da por resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no tienen particular significancia.

En una forma de realización de preferencia de este abordaje, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par híbrido de cadena pesada-cadena liviana de inmunoglobulina (que provee una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha visto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones no deseadas de cadenas de inmunoglobulina, dado que la presencia de una cadena liviana de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este abordaje se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al. *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede ser sometida a ingeniería a fin de maximizar el porcentaje de heterodímeros recuperados del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas pequeñas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas por cadenas laterales más grandes (p.ej. tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las grandes cadenas laterales en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo, por remplazo de cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (p.ej. alanina o treonina). Esto provee un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos con enlaces cruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidinas, el otro a biotina. Por ejemplo, se ha propuesto que tales anticuerpos tienen por objeto dirigir a las células del sistema inmune contra células no deseadas (Patente de los Estados Unidos No. 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados mediante el uso de cualquier método de enlaces cruzados conveniente. Los agentes formadores de enlaces cruzados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 4.676.980, junto con varias técnicas de formación de enlaces cruzados.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos mediante enlaces químicos. Brennan et al. *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento por el cual los anticuerpos intactos son escindidos proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos son reducidos en presencia del agente ditiol formador de complejos arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos e impedir la formación intermolecular de disulfuro. Los fragmentos Fab' generados son entonces convertidos en derivados tionitrobenzoato (TNB). Luego, uno de los derivados Fab'-TNB es reconvertido en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden ser usados como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los progresos recientes han facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH provenientes de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al. (1992) *J. Exp. Med.*, 175:217-225 describe la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado de *E. coli* y sometido a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de fijarse a las células con expresión excesiva del receptor ErbB2 y células T humanas normales, además de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra blancos de tumor de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para reparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos mediante el uso de cierres de leucina. Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553. Los péptidos de cierre de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al. (1993) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena liviana (V_L) mediante un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven forzados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, por lo que forman dos sitios fijadores de

antígeno. También se ha informado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios Fv (sFv). Véase Gruber et al. (1994) *J. Immunol.*, 152:5368.

5 Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147: 60.

Ensayos de fijación de anticuerpo

10 Los anticuerpos de la invención pueden ser analizados respecto de la unión inmuno-específica por cualquier método conocido en la técnica. Los ensayos que se pueden usar incluyen, sin limitaciones, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como western blots, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), inmunoensayos "en emparedado", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, para nombrar solo unos pocos. Tales ensayos son de rutina y bien conocidos en la técnica (véase, p.ej., Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora por referencia a la presente en su totalidad). Ejemplos de inmunoensayos se describen brevemente más adelante (ero no pretenden ser limitantes).

20 En general, los protocolos de inmunoprecipitación comprenden una población de células en un buffer de lisis, tal como buffer RIPA (1 % NP-40 o Triton X-100, 1 % de deoxicolato de sodio, 0,1 % de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, 1 % de Trisilol) suplementado con inhibidores de fosfatasa y/o proteasa proteica (p.ej., EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), con agregado del anticuerpo de interés al lisado celular, incubación durante cierto periodo (p.ej., 1-4 horas) a 4 °C, agregado de perlas de sefarosa proteína A y/o proteína G al lisado celular, incubación durante aproximadamente una hora o más a 4 °C, lavado de las perlas en buffer de lisis y resuspensión de las perlas en buffer de SDS/muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede ser evaluada, p.ej., mediante análisis western blot. Un experto en la técnica dispone del conocimiento sobre los parámetros que se pueden modificar para incrementar la fijación del anticuerpo a un antígeno y reducir el ruido de fondo (p.ej., preclaramiento del lisado celular con perlas de sefarosa). Para mayor análisis respecto de los protocolos de inmunoprecipitación véase, p.ej., Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 10.16.1.

35 En general, el análisis Western blot comprende la preparación de las muestras de proteína, electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poli-acrilamida (p.ej., 8 %-20 % de SDS-PAGE según el peso molecular del antígeno), transferencia de la muestra de proteína del gel de poli-acrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloqueo de la membrana en solución de bloqueo (p.ej., PBS con 3 % de BSA o leche totalmente descremada), lavado de la membrana en buffer de lavado (p.ej., PBS-Tween 20), bloqueo de la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en buffer de bloqueo, lavado de la membrana en buffer de lavado, bloqueo de la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, p.ej., un anticuerpo antihumano) conjugado con un sustrato enzimático (p.ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) o molécula radioactiva (p.ej., ³²P o ¹²⁵I) diluida en buffer de bloqueo, lavado de la membrana en buffer de lavado y detección de la presencia del antígeno. Un experto en la técnica dispone del conocimiento sobre los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada y reducir el ruido de fondo. Para mayor análisis respecto de los protocolos de western blot véase, p.ej., Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York al 10.8.1.

50 ELISA comprende preparar el antígeno, recubrir la cavidad de una placa de microtitulación de 96 cavidades con el antígeno, agregar el anticuerpo de interés conjugado a un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (p.ej., peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina) a la cavidad e incubar por cierto periodo, y detectar la presencia del antígeno. En ELISA el anticuerpo de interés no necesita estar conjugado a un compuesto detectable; en cambio, se puede agregar un segundo anticuerpo (que reconozca el anticuerpo de interés) conjugado a un compuesto detectable. Además, en lugar de recubrir la cavidad con el antígeno, se puede recubrir el anticuerpo en la cavidad. En este caso, se puede agregar un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable después de la adición del antígeno de interés a la cavidad recubierta. Un experto en la técnica dispone del conocimiento sobre los parámetros que se pueden modificar para incrementar la señal detectada y reducir el ruido de fondo así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para mayor análisis respecto de ELISA véase, p.ej., Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York al 11.2.1.

60 La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno pueden ser determinadas mediante ensayos de fijación competitiva. Un ejemplo de un ensayo de fijación competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno rotulado (p.ej., ³H o ¹²⁵I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no rotulado, y la detección del anticuerpo fijado al antígeno rotulado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno particular y las constantes de disociación se pueden determinar a partir de los datos del análisis del gráfico de Scatchard. La competencia con un segundo anticuerpo también se puede determinar mediante el uso de radioinmunoensayos. En este caso, se incuba

el antígeno con anticuerpo de interés conjugado a un compuesto rotulado (p.ej., ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no rotulado.

5 La capacidad de un anticuerpo para fijar en forma preferencial y específica un antígeno en comparación con otro antígeno puede ser determinada mediante cualquier método conocido en la técnica. A modo de ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo fija un primer antígeno en forma preferencial si fija ese primer antígeno con una constante de disociación (K_D) que es inferior al K_D del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra forma de realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo fija un primer antígeno en forma preferencial si fija dicho primer antígeno con una afinidad (es decir, K_D) que es al menos un orden de magnitud inferior al K_D del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra forma de realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo fija un primer antígeno en forma preferencial si fija dicho primer antígeno con una afinidad (es decir, K_D) que es al menos dos órdenes de magnitud inferior al K_D del anticuerpo para el segundo antígeno.

15 En otra forma de realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo fija un primer antígeno en forma preferencial si fija dicho primer antígeno con una constante fuera de la proteína (K_{off}) que es inferior al K_{off} del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra forma de realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo fija un primer antígeno en forma preferencial si fija dicho primer antígeno con una K_{off} que es al menos un orden de magnitud inferior al K_{off} del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra forma de realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo fija un primer antígeno en forma preferencial si fija dicho primer antígeno con una afinidad (es decir, K_{off}) que es al menos dos órdenes de magnitud inferior al K_{off} del anticuerpo para el segundo antígeno.

25 Los anticuerpos de la presente invención también se pueden describir o especificar en términos de su reactividad cruzada. Se incluyen los anticuerpos que no se unen a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de un polipéptido de la presente invención. Los anticuerpos que fijan polipéptidos con al menos el 100 %, al menos el 99 %, al menos el 98 %, al menos el 97 %, al menos el 96 %, al menos el 95 %, al menos el 94 %, al menos el 93 %, al menos el 92 %, al menos el 91 %, al menos el 90 %, al menos el 80 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, y al menos el 50 % de identidad (calculado mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente) con un polipéptido de la presente invención también se incluyen en la presente invención.

30 Los anticuerpos que no fijan polipéptidos con menos del 100 %, menos del 99 %, menos del 98 %, menos del 97 %, menos del 96 %, menos del 95 %, menos del 94 %, menos del 93 %, menos del 92 %, menos del 91 %, menos del 90 %, menos del 80 %, menos del 70 %, menos del 60 % y menos del 50 % de identidad (calculado mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente) con un polipéptido de la presente invención también se incluyen en la presente invención. También se incluyen en la presente invención los anticuerpos que fijan polipéptidos codificados por polinucleótidos que se hibridan a un polinucleótido de la presente invención bajo condiciones rigurosas de hibridación (tal como se describe en la presente). Los anticuerpos de la presente invención también se pueden describir o especificar en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención.

40 Usos terapéuticos

Se describen métodos para el diagnóstico y el tratamiento de trastornos óseos. Los métodos pueden comprender el uso de una composición de unión específica para un polipéptido de MDL-1, p.ej., un anticuerpo o su fragmento fijador de antígeno o una proteína MDL-1 soluble. También se proveen composiciones fijadoras control, p.ej., anticuerpos control, véase, p.ej., Lacey et al. (2003) *Arthritis Rheum.* 48:103-109; Choy y Panayi (2001) *New Engl. J. Med.* 344:907-916; Greaves y Weinstein (1995) *New Engl. J. Med.* 332:581-588; Robert y Kupper (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1817-1828; Lebowitz (2003) *Lancet* 361:1197-1204.

50 En ciertas formas de realización, se usan antagonistas de MDL-1, incluso anticuerpos específicos para proteína MDL-1 para inhibir la resorción ósea, incluso la formación y la activación de osteoclastos. Los antagonistas de MDL-1 también se pueden administrar a un sujeto para inducir la formación ósea, incluso la activación de osteoblastos. Para inducir la formación ósea, se pueden administrar antagonistas de MDL-1 solos o en conjunción con terapias adicionales de estándar de cuidado, tal como se describe más adelante.

55 Los métodos para la administración conjunta o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, p.ej., una citocina, un agente quimioterápico, antibiótico o radiación, son bien conocidos en la técnica (Hardman, et al. (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10^o ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA).

65 Los ejemplos de tales agentes terapéuticos adicionales incluyen un agente que trata los trastornos asociados a osteoclastos, un agente quimioterápico, un fármaco de la clase de los interferones tal como interferón-alfa (p.ej., de Amarillo Biosciences, Inc.), IFN- β -1a (REBIF® y AVONEX®) o IFN- β -1b (B ETASERON®), un oligopéptido tal como acetato de glatiramer (COPAXONE®), un agente bloqueador de ligando CD40-CD40, un agente citotóxico o inmunosupresor (tal como mitoxantrona (N OVANTRONE®), metotrexato, ciclofosfamida, clorambucilo, leflunomida

y azatioprina), inmunoglobulina intravenosa (gammaglobulina), terapéutica eliminadora de linfocitos (p.ej., mitoxantrona, ciclofosfamida, anticuerpos CAMPATH®, antiCD4, cladribina, irradiación total del organismo, trasplante de médula ósea, antagonista o anticuerpo de integrina (p.ej., un anticuerpo LFA-1 tal como efalizumab/RAPTIVA® disponible en el comercio de Genentech, o un anticuerpo alfa 4 integrina tal como natalizumab/TYSABRI® disponible de Biogen Idec u otros tal como se observó con anterioridad), esteroides tales como corticosteroides (p.ej., metilprednisolona tal como S OLU-MEDROL® metilprednisolona succinato de sodio para inyección, prednisona tal como prednisona de dosis baja, dexametasona, o glucocorticoides, p.ej., por inyección conjunta, incluso terapéutica sistémica con corticosteroides), terapéutica inmunosupresora no eliminadora de linfocitos (p.ej., MMF o ciclosporina), fármacos reductores de colesterol de la clase de "estatinas" (que incluye cerivastatina (BAYCOL®), fluvastatina (L ESCOL®), atorvastatina (LIPITOR®), lovastatina (MEVACOR®), pravastatina (P RAVACHOL®) y simvastatina (ZOCOR®)), estradiol, testosterona (opcionalmente a dosis elevadas; Stuve et al. *Necrology* 8:290-301 (2002)), andrógenos, terapéutica de reemplazo hormonal, un inhibidor de TNF tal como un anticuerpo para TNF- α , un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD), un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID), plasmaféresis o intercambio plasmático, trimetoprima-sulfametoxazol (BACTRIM®, SEPTRA®), mofetilmicofenolato, bloqueadores H2 o inhibidores de la bomba de protones (durante el uso de terapéutica inmunosupresora potencialmente ulcerogénica), levotiroxina, ciclosporina A (p.ej. SANDIMMUNE®), análogo de somatostatina, citocina, antimetabolitos, agente inmunosupresor, cirugía de rehabilitación, yodo radiactivo, tiroidectomía, antagonista de BAFF tal como anticuerpos o inmunoadhesinas BAFF o BR3, receptor anti-CD40 o ligando anti-CD40 (CD154), antagonista/anticuerpo de receptor anti-IL-6, un antagonista o anticuerpo de superficie de células B tal como un anticuerpo CD20 humanizado o humano, anticuerpos IL-17 y/o IL-23, etc. También se incluyen las terapéuticas de combinación que utilizan bisfosfonatos (p.ej., alendronato, ibandronato, risedronato, risedronato con carbonato de calcio, ácido zoledrónico) e inhibidores de catepsina K.

Una cantidad efectiva de agente terapéutico generalmente reducirá los síntomas en al menos el 10 %; usualmente en al menos el 20 %; de preferencia en al menos el 30 %; con mayor preferencia en al menos el 40 %, y con mayor preferencia aún en al menos el 50 %.

Las formulaciones de los agentes terapéuticos se pueden preparar para almacenamiento al mezclarlo con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables, p.ej., en la forma de polvos liofilizados, suspensiones, soluciones o suspensiones acuosas, véase, p.ej., Hardman, et al. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY,

La determinación de la dosis apropiada es efectuada por el clínico, p.ej., mediante el uso de parámetros o factores de los que se conoce o sospecha en la técnica que afectan el tratamiento, o que se prevé que afectarán el tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor de la dosis óptima y a continuación se aumenta con pequeños incrementos hasta alcanzar el efecto deseado u óptimo respecto de cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen a los síntomas, p.ej., de la inflamación o la concentración de citocinas inflamatorias producidas. De preferencia, un agente biológico a usar se deriva de la misma especie que el animal al que se dirige el tratamiento, por lo que se minimiza la respuesta humoral al reactivo.

Una cantidad efectiva para un paciente particular puede variar según factores tales como la condición tratada, la salud general del paciente, la vía del método y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Cuando está en combinación, una cantidad efectiva estará en proporción con una combinación de los componentes y el efecto no se limita a los componentes individuales solos. Se dispone de pautas para los métodos de tratamiento y diagnóstico (Maynard, et al. (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, RU).

También se describe un kit que comprende una célula y un compartimiento, un kit que comprende una célula y un reactivo, un kit que comprende una célula e instrucciones de uso o disposición, así como un kit que comprende una célula, un compartimiento y un reactivo.

Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de anticuerpo de la invención se pueden administrar, de preferencia para los fines terapéuticos, a un sujeto, de preferencia en una composición farmacéutica. De preferencia, una composición farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las moléculas de anticuerpo se pueden usar terapéuticamente (p.ej., en una composición farmacéutica) dirigidas al receptor MDL-1 y, así tratar cualquier condición médica causada o mediada por el receptor.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son convencionales y muy bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen vehículos acuosos y no acuosos, estabilizantes, antioxidantes, solventes, medios de dispersión, cubiertas,

agentes antimicrobianos, buffers, proteínas séricas, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. De preferencia, el vehículo es adecuado para la inyección dentro del organismo del sujeto. En general, las composiciones de utilidad para la administración parenteral de tales fármacos son bien conocidos; p.ej., Remington's Pharmaceutical Science, 17° Ed. (Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990).

5 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como etiloleato. Se debe mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de cubierta, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de las partículas en el caso de dispersiones, y mediante el uso de agentes tensioactivos.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en conjunción con una segunda composición o sustancia farmacéutica. Cuando se usa una terapéutica de combinación, ambas composiciones se deben formular en una única composición para la aplicación simultánea o formular por separado en dos o más composiciones (p.ej., un kit).

20 Los analgésicos pueden incluir aspirina, acetaminofeno, codeína, morfina, apomorfina, normorfina, etorfina, buprenorfina, hidrocodona, racemorfan, levorfanol, butorfanol, metadona, demerol, ibuprofeno u oxicodona.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir otros tipos de sustancias, incluso pequeñas moléculas orgánicas y análogos de ligandos inhibidores, los cuales se pueden identificar mediante los ensayos descritos en la presente.

25 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica. Véase, p.ej., Gilman et al. (eds.) (1990), *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8° Ed., Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, supra, Easton, Penn.; Avis et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, Nueva York; Lieberman et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Dekker, Nueva York; y Lieberman et al. (eds.) (1990), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* Dekker, Nueva York.

35 Otra formulación y método de aplicación de la presente incluye el descrito, por ejemplo, en WO 2004/078140, incluso la tecnología de aplicación de fármacos ENHANZE™ (Halozyme Inc.). Esta tecnología se basa en una hialuronidasa recombinante humana (rHuPH20). rHuPH20 es una forma recombinante de la enzima humana que aparece en la naturaleza, aprobada por FDA, que abre espacio temporariamente en la matriz de tejidos tales como la piel. Es decir, la enzima tiene la capacidad de degradar el ácido hialurónico (HA), la sustancia similar "gel" que ocupa los espacios y es un componente importante de los tejidos de todo el organismo. Se espera que esta actividad de abrir espacios permita a rHuPH20 mejorar la aplicación del fármaco y la biodisponibilidad del agente terapéutico al aumentar el ingreso de las moléculas terapéuticas a través del espacio subcutáneo. En consecuencia, cuando se combina o coformula con ciertos fármacos inyectables, esta tecnología puede actuar como "machete molecular" para facilitar la penetración y la dispersión de estos fármacos al abrir temporariamente los canales de flujo debajo de la piel. Moléculas de hasta 200 nanómetros pueden pasar libremente a través de la matriz extracelular perforada, que recobra su densidad normal en aproximadamente 24 horas, lo cual conduce a una plataforma de aplicación de un fármaco que no altera permanentemente la arquitectura de la piel.

45 Se describe un método para administrar el anticuerpo MDL-1 de la presente a un tejido que contiene cantidades excesivas de glucosaminoglucano, que comprende administrar una glucoproteína hialuronidasa (sHASEGP) (donde esta proteína comprende un polipéptido de hialuronidasa neutra activa soluble y al menos una porción azúcar ligada a N, en donde la porción azúcar ligada a N está adosada covalentemente a un residuo de asparagina del polipéptido) al tejido en una cantidad suficiente para degradar los glucosaminoglucanos lo suficiente para abrir canales de menos de aproximadamente 500 nanómetros de diámetro; y administrar el anticuerpo o la proteína soluble al tejido que comprende los glucosaminoglucanos degradados.

55 También se describe un método para incrementar la difusión de un anticuerpo o proteína soluble de la presente que se administra a un sujeto, que comprende la administración al sujeto de un polipéptido en una cantidad suficiente para abrir o formar canales menores que el diámetro del anticuerpo y administrar el anticuerpo, por lo que se incrementa la difusión de la sustancia terapéutica. Se puede administrar sHASEGP y anticuerpo por separado o simultáneamente en una formulación, y consecutivamente en cualquier orden o al mismo tiempo.

60 El régimen de dosificación utilizado en una aplicación terapéutica puede ser determinada por un médico, considerando diversos factores que pueden modificar la acción de la sustancia terapéutica, p.ej., la condición, el peso corporal, el género y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el momento de administración y otros factores clínicos.

A menudo, las dosis de tratamiento son tituladas hacia arriba a partir de una concentración baja, a fin de optimizar la seguridad y la eficacia. Las dosis se pueden ajustar teniendo en cuenta los menores tamaños moleculares y la posibilidad de vidas medias reducidas (tiempo de depuración) tras la administración.

5 Los protocolos generales para la administración terapéutica de tales sustancias son bien conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar, por ejemplo, por vías parenterales (p.ej., inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intratumoral o por infusión) o por una vía no parenteral (p.ej., administración oral, administración pulmonar o administración tópica).

10 Las composiciones se pueden administrar por dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una forma de realización de preferencia, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar por inyección con una aguja hipodérmica.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar con un dispositivo de inyección sin aguja hipodérmica; tal como los dispositivos descritos en las Patentes de los Estados Unidos No. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556.

20 Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos de utilidad en la presente invención incluyen: la Patente de los Estados Unidos No. 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar la medicación a una tasa controlada; la Patente de los Estados Unidos No. 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para proveer la medicación a una tasa de infusión precisa; la Patente de los Estados Unidos No. 4.447.224, que describe un aparato e infusión implantable de flujo variable para la administración continua del fármaco; la Patente de los Estados Unidos No. 4.439.196, que describe un sistema osmótico de administración de un fármaco, que cuenta con compartimientos de múltiples cámaras.

25 EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos ejemplifican la presente invención y no deben ser interpretados como limitación del amplio alcance de la invención.

30 I. Métodos generales

Algunos de los métodos estándar se describen o refieren, p.ej., en Maniatis, et al. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook, et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2° ed.), vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel, et al., *Biology*, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel, et al. (1987 y Suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, Nueva York. Los métodos para la purificación de la proteína incluyen métodos tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de columna, electroforesis, centrifugación, cristalización, y otros. Véase, p.ej., Ausubel, et al. (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" en *Meth. Enzymol.*, vol. 182, y otros volúmenes de esta serie y bibliografía de los fabricantes sobre los usos de los productos de purificación de proteínas, p.ej., Pharmacia, Piscataway, N.J., o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permiten la fusión con segmentos apropiados, p.ej., a una secuencia FLAG o un equivalente que se puede fusionar mediante una secuencia removible por proteasa. Véase, p.ej., Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) *Genetic Engineering, Principle and Methods* 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; y Crowe, et al. (1992) *QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System*, Qiagen, Inc., Chatsworth, CA.

50 Se realiza el análisis de secuencias computarizadas, p.ej., mediante programas de software disponibles, incluso los de las fuentes GCG (U. Wisconsin) y GenBank. También se utilizan bases de datos de secuencias públicas, p.ej., de GenBank y otras.

II. Antagonistas y anticuerpos

55 Se generaron anticuerpos anti-agonista MDL-1 de ratón (p.ej., DX163, IgG1 de ratón) a partir de un ratón BALB/c inmunizado con una proteína de fusión que consistía del dominio extracelular del gen MDL-1 humano fusionado al dominio Fc de hlg, tal como se describió antes (véase, p.ej., Wright et al. (2003) *J Immunol.* 171:3034-3046). El dominio extracelular de la proteína de fusión contenía el dominio de lectina tipo C y correspondía a las posiciones de aminoácido 26-187 de MDL-1 humano (Número de acceso a GenBank # BC112099; SEQ ID NO: 2).

60 Dado que no se ha identificado el ligando para el receptor MDL-1, se generó una forma soluble de MDL-1 que podía fijar el ligando endógeno e inhibir las actividades de MDL-1 *in vivo*. Este antagonista soluble de MDL-1 se compone de la porción extracelular (163 aminoácidos) de la forma larga de MDL-1 de ratón (número de acceso a GenBank AA186015; SEQ ID NO: 4) y se ligó a un plásmido de expresión pCMV1 que contiene la porción Fc de mlgG2a que ha sido mutada (L a E; véase, p.ej., Duncan et al. (1988) *Nature* 332:563-564) para bajas propiedades de fijación de FcγRI. La proteína se expresó en 293 células de estilo libre.

III. Estimulación celular

Para la activación de MDL-1, se incubaron neutrófilos recién aislados y resuspendidos (107 células/mL) en RPMI 1640 con 10 % de suero bovino fetal con anticuerpo anti-MDL-1 (10 mg/mL) o IgG1 control de ratón durante 1h a 37 °C y 5 % de CO₂ en placas de 96 cavidades (Nunc, Dinamarca). Después de dos lavados con RPMI, los anticuerpos anti-hMDL-1 fijados a las células fueron inducidos a formar enlaces cruzados con 9 mg/mL de fragmento F(ab')₂ de anticuerpo IgG de cabra anti-ratón (H+L) durante 30 min a 37 °C y 5 % de CO₂. Luego se lavaron las células dos veces y se incubaron con 20 mg/mL de anticuerpo IgG cromopuro de ratón durante 20 min a 4 °C para bloquear el anticuerpo formador de enlaces cruzados no fijado. En algunos experimentos, se estudiaron diferentes dosis de anticuerpo anti-MDL-1 y control de isotipo m IgG1 (0,1 ng/mL -20 mg/mL). Después de la incubación de MDL-1 o mIgG1, las células se trataron durante 22 horas con 0,2 ng/mL de LPS o medio.

La Figura 1 muestra que la activación de MDL-1 aumenta la liberación inducida por LPS de los mediadores inflamatorios.

IV. Artritis inducida por colágeno

En estos experimentos, ratones B10RIII fueron inmunizados en la base de la cola con 100 ug de colágeno bovino en coadyuvante de Freund completo. El día 26 y el día 32 se administraron a los ratones inyecciones intraperitoneales de 50 ug o 500 ug de anticuerpo de control de isotipo o DX163 (anticuerpo de rata anti-agonista de MDL-1 de ratón). Luego se monitorearon los ratones y se calificó el desarrollo de artritis en cada pata, sobre la base de una escala de enfermedad de cuatro puntos. Las calificaciones clínicas se basan en hinchazón de la pata por extremidad. Calificación 1= 1 dedo, 2= dos o más dedos 3= hinchazón de toda la pata. La máxima calificación clínica por ratón es 12.

Los ratones tratados con fusión de MDL-1-Ig fueron altamente resistentes a ambos CIA, comparado con los controles y esto contrasta con la mayor enfermedad observada en ratones tratados con anti- agonista MDL-1. La Figura 2 muestra la exacerbación de CIA con la administración del anticuerpo del agonista de MDL-1, DX163. La Figura 3 muestra la inhibición de CAIA por la proteína de fusión de MDL-1-Ig antagonista de MDL-1.

V. Artritis inducida por anticuerpo de colágeno

Se administró a ratones B10 RIII (n=5 por grupo) o ratones MDL-1 -/-KO 800 ug del cóctel artrogénico CIA de Chemicon iv para inducir c artritis inducida por anticuerpo de colágeno el Día 0. Después se administró a los ratones una única dosis de 0,5 mg sc de anticuerpo control de isotipo IgG1 o DX163 (MDL-1 de rata anti-ratón). La calificación clínica se basa en la hinchazón de la pata por extremidad. Calificación 1= 1 dedo, 2= dos o más dedos 3= hinchazón de toda la pata. La máxima calificación clínica por ratón es 12.

Los ratones tratados con DX163 tuvieron calificaciones aumentadas para todos los parámetros examinados. Cortes teñidos con H&E que compararon animales no expuestos tratados con isotipo IgG1, y tratados con DX163 mostraron marcados incrementos de infiltrado/invasión de neutrófilos, erosión ósea y formación de pannus en los animales tratados con DX163. Las Figuras 4 muestran menores calificaciones de CAIA en ratones MDL-1 KO. La Figura 5 confirma que la actividad agonista de MDL-1 con DX163 puede exacerbar el desarrollo de artritis autoinmune.

También se administró proteína de fusión MDL-1 Ig en el mismo modelo. A los ratones B10 RIII (n=5 por grupo) se administró 1000 ug de cóctel artrogénico CIA de Chemicon iv para inducir artritis inducida por anticuerpo de colágeno el Día 0. Se administró a los ratones una dosis de 0,5 mg sc de anticuerpo de control de isotipo IgG1, DX163 (MDL-1 de rata anti-ratón), control de Ig, o proteína de fusión MDL-1 Ig el Día 0 y el Día 2. Se midió la hinchazón de las patas tal como se describió antes. La Figura 6 muestra la inhibición de CAIA con proteína de fusión MDL-1-Ig.

VI. Evaluación histopatológica

Las patas se retiraron, fijaron, descalcificaron en Cal-EX II (Fisher Scientific) durante 7 días, y se incluyeron en parafina. Después se prepararon cortes de las patas y se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se examinaron con microscopio óptico. Se realizó un análisis histológico de los tejidos sinovial, óseo y cartílago como prueba ciega. Se examinó la calificación de la infiltración de leucocitos, y más específicamente el porcentaje de PMN infiltrados en el espacio sinovial y articular. Además del reclutamiento celular, también se evaluó la formación de pannus. En los tejidos óseo y cartilaginoso se calificó la destrucción del cartílago y las erosiones del hueso cortical. La gravedad se calificó en una escala de 0-4. Se evaluaron las comparaciones entre grupos mediante la prueba t no pareada de dos colas con un valor p de <0,05 considerado como estadísticamente significativo. Se realizaron los cálculos con el paquete estadístico, GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

La Figura 7 muestra las patas provenientes de ratones B10RIII que fueron escaneados con un escáner TC GE explore. Se compararon las articulaciones de los ratones no expuestos e inducidos por CAIA, tratados con proteína de fusión MDL-1 Ig o DX163. Se tomaron muestras de hueso el Día 12 del experimento. El tratamiento con agonista

anti-MDL-1 indujo considerable destrucción de hueso cortical, comparado con el daño moderado en el grupo control Ig. En contraste, los ratones tratados con fusión MDL-1-Ig mostraron integridad ósea y densidad comparable a los ratones no expuestos, lo cual confirma que el bloqueo de la señal MDL-1 impidió la resorción ósea.

5 VII. Análisis por RT-PCR y por Affymetrix MicroArray

Se extrajo ARN de las patas y se prepararon ADN complementarios tal como se describió (Murphy, 2002) y se usaron para RT-PCR y análisis de expresión génica Affymetrix. Para RT-PCR, se analizó la expresión génica de un rango de genes mediante el sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems). Se usó el gen constitutivo ubiquitina para normalizar el análisis. Para el análisis con Affymetrix, se sintetizó ARN total tratado con ADNasa en una sonda cARN biotinilada usando rotulado de blanco de un ciclo y rotulado IVT (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se hibridaron 15 mg de la sonda cARN biotinilada de cada muestra en chips murinos MOE430 2.0 Affymetrix Microarray. Luego se lavaron los chips hibridados con la estación Affymetrix GeneChip Fluidics 400 y se escanearon en el Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizaron la calidad de la síntesis de la sonda cARN y la eficiencia de la hibridación en el Sistema operativo GeneChip para cada chip Affymetrix una vez completado el escaneado. Luego se normalizaron los datos del chip con MAS 5.

A fin de investigar las vías inmunes reguladas por la activación de MDL-1, se evaluó la expresión de las citocinas proinflamatorias, quimiocinas, las moléculas de adhesión celular y los marcadores de células mieloides mediante ensayo cuantitativo RT-PCR. Se evaluaron los genes de de los osteoclastos (ATP6VOD2 y catepsina K) por análisis Affymetrix. El Día 4 después de la inducción de CAIA, los genes pro-inflamatorios tales como IL-1 β , IL-6 y TNF α aparecieron expresados en abundancia en todas las patas artríticas provenientes de los ratones tratados con anti-agonista MDL-1, comparados con los controles Ig. Es importante destacar que los genes asociados con destrucción ósea tales como RANKL, metaloproteasa de matriz 9 (MMP9) y TRAP estaban regulados hacia arriba después del tratamiento anti-agonista MDL-1 y regulados hacia abajo en el tratamiento con fusión MDL-1-Ig (véase Figura 8). Los resultados de la expresión génica junto con los hallazgos histopatológicos sugieren que MDL-1 juega un papel importante en el reclutamiento y la activación de macrófagos y neutrófilos inflamatorios, que median la lesión del tejido sinovial. Además, la inducción de los genes específicos de osteoclastos y los hallazgos de micro TC de rayos X sugieren que la vía MDL-1-DAP12 también podría tener un papel en el metabolismo óseo.

Los resultados de la expresión fueron transferidos a Spotfire DecisionSite (Spotfire, Somerville, MA) para el filtrado de los datos y el análisis de los gráficos. Se desecharon por filtrado los conjuntos de sondas que tenían intensidad de señal inferior a 20 y una llamada de detección de "A" (Ausente) en todas las muestras. Se generaron listas de comparación para las muestras usando veces de cambio como proporción firmada. Esas listas se usaron para el ulterior análisis de la vía en Ingenuity Systems (Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA).

VIII. Cultivos de osteoclastos *in vitro*

40 Células de médula ósea derivadas de ratones C57BL/6 o B10RIII de 12 semanas de edad fueron cultivadas durante 2 días en medio alpha-mem (Gibco) con 50 ng/mL de MSCF recombinante (R&D). Luego se plaquearon las células con adhesión laxa en 4-8 x 10E5/mL en placas de cultivo de tejido con o sin la adición de astillas de hueso bovino (Nordic Biosciences, NY). Las células fueron tratadas con un rango de dosis de RANK-L (0-100 ng/mL) y agonista MDL-1 o anticuerpos de control a (0-50 ug/mL). Se evaluaron las condiciones para la cinética de formación de osteoclastos, el perfil de citocina del cultivo celular por Luminex (Linco Inc.), el análisis RT-PCR de los cultivos celulares, la tinción TRAP (equipo de tinción para fosfatasa alcalina, Sigma), y ensayo ELISA del extracto nuclear (kit de ensayo de factor de transcripción TransAM NFATc1, Active Motif).

La tinción con TRAP de células de médula ósea cultivadas en MCSF indicó que el tratamiento con RANK-L y anticuerpo del agonista de MDL-1 incrementó la formación de osteoclastos y aumentó la resorción ósea. La Figura 9 mostró que el tratamiento con RANK-L en combinación con anticuerpo antiagonista MDL-1 incrementó la expresión del "regulador maestro de la transcripción" de osteoclastos NFATc1, que controla la transcripción corriente abajo de DC STAMP, ATP6VOD2 (requerido para las fusiones celulares), catepsina K, MMP9, ATP6I, CIC7 (requerido para la resorción ósea).

IX. Análisis estadístico

Se evaluaron las comparaciones entre los grupos con la prueba t no pareada de dos colas. Se consideró estadísticamente significativo un valor p de <0,05. Se realizaron los cálculos con un paquete estadístico, GraphPad Prism 4 (Graph- Pad Software, San Diego, CA).

Listado de secuencias

<110> Schering Corporation Bigler, Michael E Cua, Daniel J Joyce-Shaikh, Barbara Phillips, Joseph H

<120> MDL-1 USOS

ES 2 540 854 T3

<130> BP06654

<150> 60/947,314<151> 2007-06-29

5

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

10

<210> 1

<211> 996

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

```

ggcttagcgt ggtcgcggcc gaggtggcaa aaggagcata ttctcaggag acggggcccc      60
tgcctgccac accaagcatt aggccaccag gaagaccccc atctgcaagc aagcctagcc      120
ttccagggag aaagaggcct ctgcagctcc ttcacatga actggcacat gatcatctct      180
gggcttattg tggtagtgct taaagttggt ggaatgacct tatttctact ttatttccca      240
cagatTTTTa acaaaagtaa cgatggtttc accaccacca ggagctatgg aacagtctca      300
cagatTTTTg ggagcagttc cccaagtccc aacggcttca ttaccacaag gagctatgga      360
acagtctgcc ccaaagactg ggaatTTTat caagcaagat gTTTTTctt atccacttct      420
gaatcatctt ggaatgaaag cagggacttt tgcaaaggaa aaggatccac attggcaatt      480
gtcaacacgc cagagaaact gtttcttcag gacataactg atgctgagaa gtattttatt      540
ggcttaattt accatcgtga agagaaaagg tggcgttgga tcaacaactc tgtgttcaat      600
ggcaatgta ccaatcagaa tcagaatttc aactgtgca ccattggcct aacaagacc      660
tttgatgctg catcatgtga catcagctac cgcaggatct gtgagaagaa tgccaaatga      720
tcacagttcc ctgtgacaag aactatactt gcaactcttt ttgaatccat aacaggtcgt      780
actggccaat gattactttt acttacctat ctgtactacc agtagcggtc cttgccatt      840
tgggaaactg agcttctttc ttctgcactg ggggactgga tgctagccat ctccaggaga      900
caggatcagt tttacggaaa caactcagtt agtatagaga tgaggtccgc ttctgtagta      960
ccttccttca aataaagaaa tttggtacct gcccgg      996

```

20

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<220>

<221> DOMINIO

<222> (26)..(188)

<223> dominio extracelular

30

<400> 2

ES 2 540 854 T3

Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Leu Lys
 1 5 10 15

Val Val Gly Met Thr Leu Phe Leu Leu Tyr Phe Pro Gln Ile Phe Asn
 20 25 30

Lys Ser Asn Asp Gly Phe Thr Thr Thr Arg Ser Tyr Gly Thr Val Ser
 35 40 45

Gln Ile Phe Gly Ser Ser Ser Pro Ser Pro Asn Gly Phe Ile Thr Thr
 50 55 60

Arg Ser Tyr Gly Thr Val Cys Pro Lys Asp Trp Glu Phe Tyr Gln Ala
 65 70 75 80

Arg Cys Phe Phe Leu Ser Thr Ser Glu Ser Ser Trp Asn Glu Ser Arg
 85 90 95

Asp Phe Cys Lys Gly Lys Gly Ser Thr Leu Ala Ile Val Asn Thr Pro
 100 105 110

Glu Lys Leu Lys Phe Leu Gln Asp Ile Thr Asp Ala Glu Lys Tyr Phe
 115 120 125

Ile Gly Leu Ile Tyr His Arg Glu Glu Lys Arg Trp Arg Trp Ile Asn
 130 135 140

Asn Ser Val Phe Asn Gly Asn Val Thr Asn Gln Asn Gln Asn Phe Asn
 145 150 155 160

Cys Ala Thr Ile Gly Leu Thr Lys Thr Phe Asp Ala Ala Ser Cys Asp
 165 170 175

Ile Ser Tyr Arg Arg Ile Cys Glu Lys Asn Ala Lys
 180 185

- 5 <210> 3
- <211> 896
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

ES 2 540 854 T3

```

<400> 3
aggacattac cgagcaggag catacatttc cagagcaagg agccctgctc gctgcaccga      60
atatcttata aaaaagactc ctatctgtat gccaacccag acttcccaga agagatcaga      120
tcctgatcc cccatcatca tgaactggca catgatcadc tcggggctta tcgtagtagt      180
gatcaaagtt gttggaatga ccttttttct gctgtatttc ccacaggttt ttggcaaaag      240
taatgatggc ttcgtcccca cggagagcta cggaaccact agtgtgcaga atgtctcaca      300
gatctttggg agaaatgacg aaagtacat gcctacaagg agctatggaa cagtctgtcc      360
cagaaaactgg gattttcacc aaggaaaatg ctttttcttc tccttctccg aatcaccttg      420
gaaagacagc atggattatt gtgcaacaca aggatccaca ctggcaattg tcaacactcc      480
agagaaactg aagtatcttc aggacatagc tggattgag aattacttta ttggtttggt      540
acgtcagcct ggagagaaaa agtggcgcctg gatcaacaac tctgtgttca atggcaatgt      600
taccaatcag gaccagaact tcgactgtgt cactataggt ctgacgaaga catatgatgc      660
tgcacatgt gaagtcagct atcgctggat ctgcaaatg aatgccaaat gatcatagat      720
ctctacaaga gtgaatTTTT acagagctag caaaggagat tagttgtgac tgaaccagc      780
ccaggaaaat atagagcadc aaagactgtg cccatcttca taggtgggag ttcctattg      840
aatcctcaaa gtcaattttg ttactccaca aacatcttac catagtaaaa ctcct      896

```

```

<210> 4
5 <211> 190
  <212> PRT
  <213> Mus musculus

```

```

10 <220>
    <221> DOMINIO
    <222> (26) .. (190)
    <223> dominio extracelular
    <400> 4

```

```

Met Asn Trp His Met Ile Ile Ser Gly Leu Ile Val Val Val Ile Lys
1           5           10           15

```

```

Val Val Gly Met Thr Phe Phe Leu Leu Tyr Phe Pro Gln Val Phe Gly
          20           25           30

```

```

15 Lys Ser Asn Asp Gly Phe Val Pro Thr Glu Ser Tyr Gly Thr Thr Ser
          35           40           45

```

ES 2 540 854 T3

Val Gln Asn Val Ser Gln Ile Phe Gly Arg Asn Asp Glu Ser Thr Met
50 55 60

Pro Thr Arg Ser Tyr Gly Thr Val Cys Pro Arg Asn Trp Asp Phe His
65 70 75 80

Gln Gly Lys Cys Phe Phe Phe Ser Phe Ser Glu Ser Pro Trp Lys Asp
85 90 95

Ser Met Asp Tyr Cys Ala Thr Gln Gly Ser Thr Leu Ala Ile Val Asn
100 105 110

Thr Pro Glu Lys Leu Lys Tyr Leu Gln Asp Ile Ala Gly Ile Glu Asn
115 120 125

Tyr Phe Ile Gly Leu Val Arg Gln Pro Gly Glu Lys Lys Trp Arg Trp
130 135 140

Ile Asn Asn Ser Val Phe Asn Gly Asn Val Thr Asn Gln Asp Gln Asn
145 150 155 160

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

Cys Glu Val Ser Tyr Arg Trp Ile Cys Glu Met Asn Ala Lys
180 185 190

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista de MDL-1 que es un anticuerpo o el correspondiente fragmento de anticuerpo que fija específicamente MDL-1 SEQ ID NO:2 o 4 o una proteína MDL-1 soluble SEQ ID NO:2 o 4, para usar en el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por pérdida ósea.
2. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo es humanizado.
- 10 3. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo es totalmente humano.
4. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo es quimérico.
- 15 5. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab₂ o Fv.
- 20 6. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o la proteína MDL-1 soluble están conjugados a otro resto químico.
7. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 6, donde el resto químico es polietilenglicol (PEG).
- 25 8. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde la proteína MDL-1 soluble se fusiona a una porción Fc de una molécula de anticuerpo.
9. Uso de un antagonista de MDL-1 tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la fabricación de un medicamento para el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad caracterizada por pérdida ósea.
- 30 10. Un antagonista de MDL-1 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la coadministración con un segundo agente terapéutico.

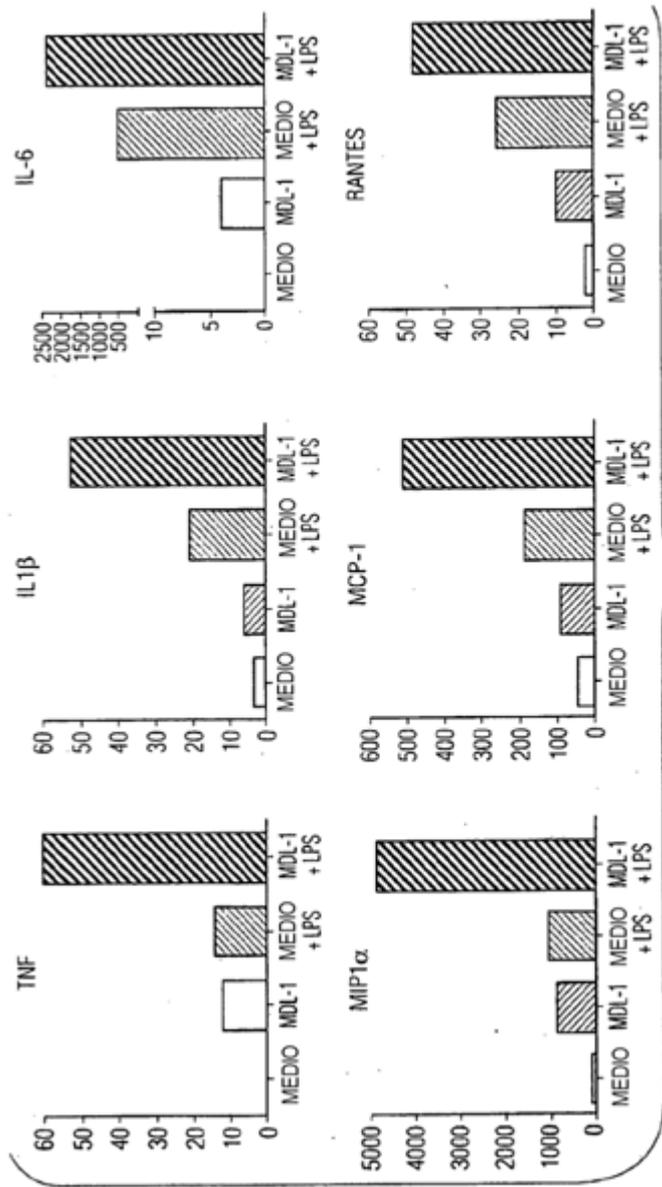


FIG. 1

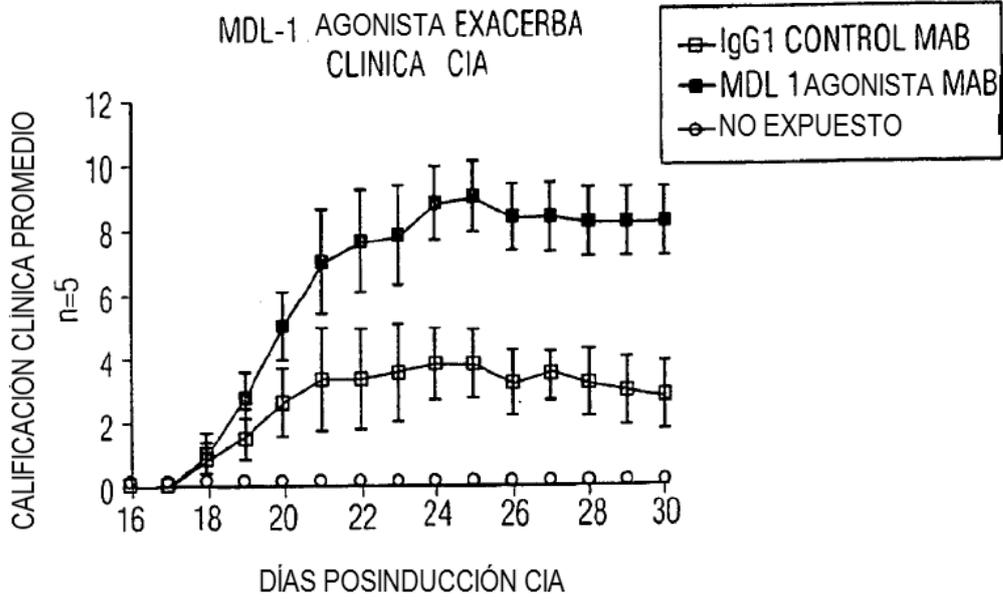


FIG. 2

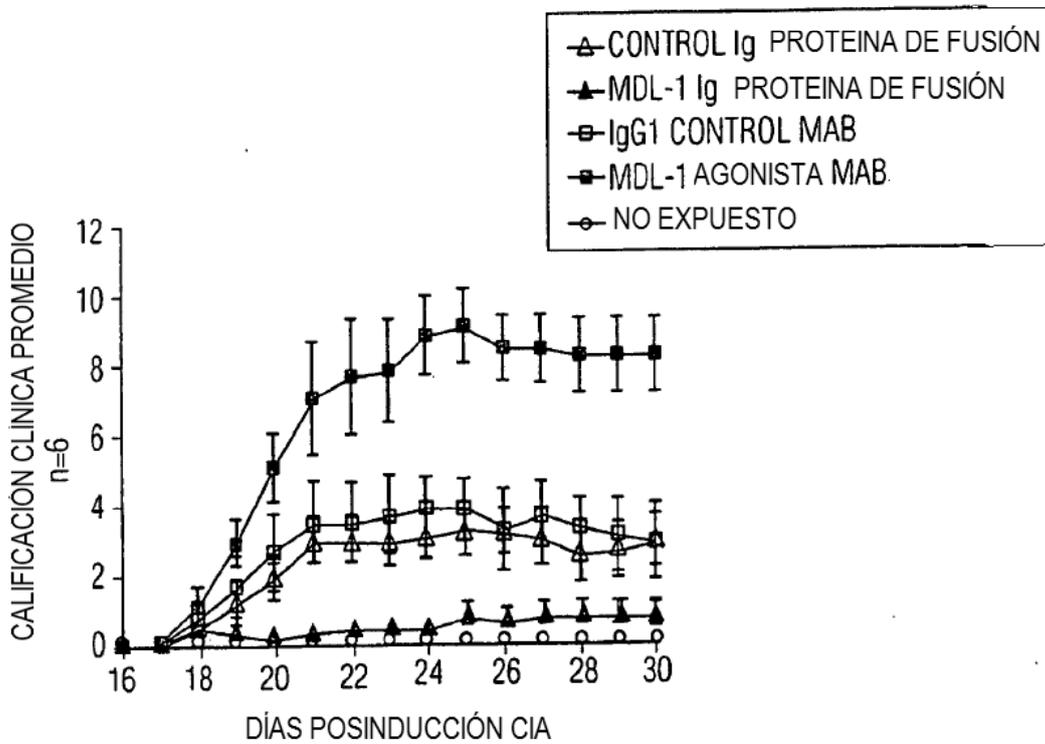


FIG. 3

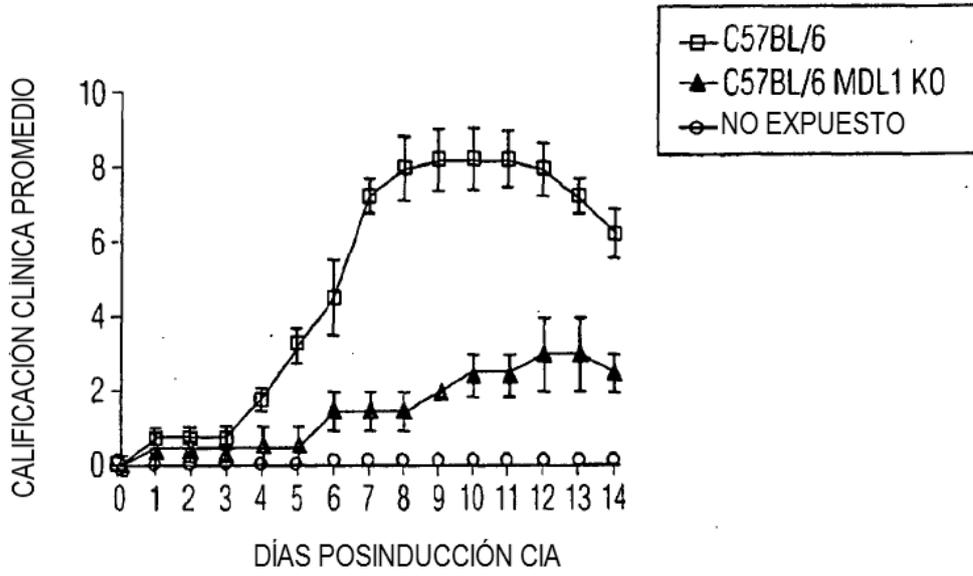


FIG. 4

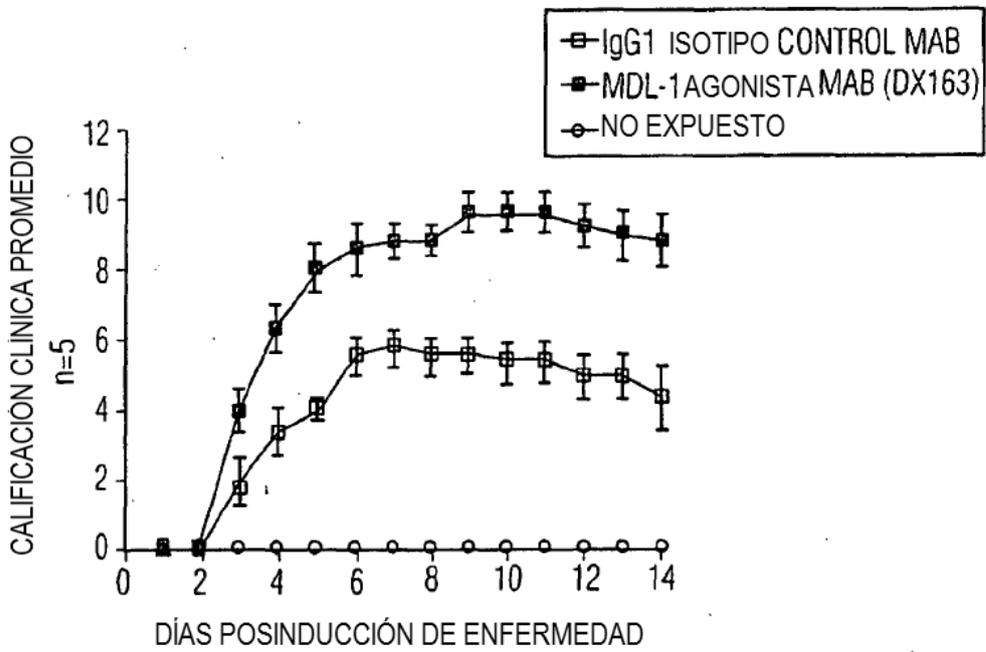


FIG. 5

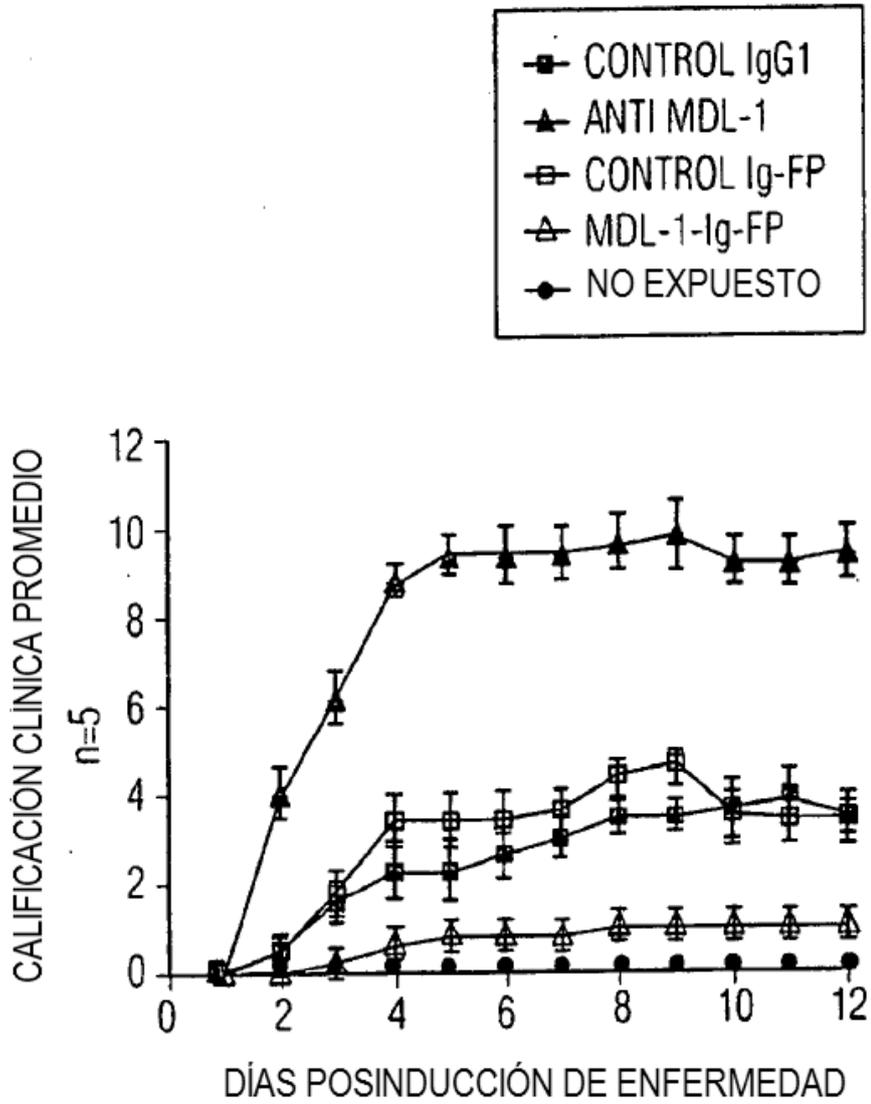


FIG. 6

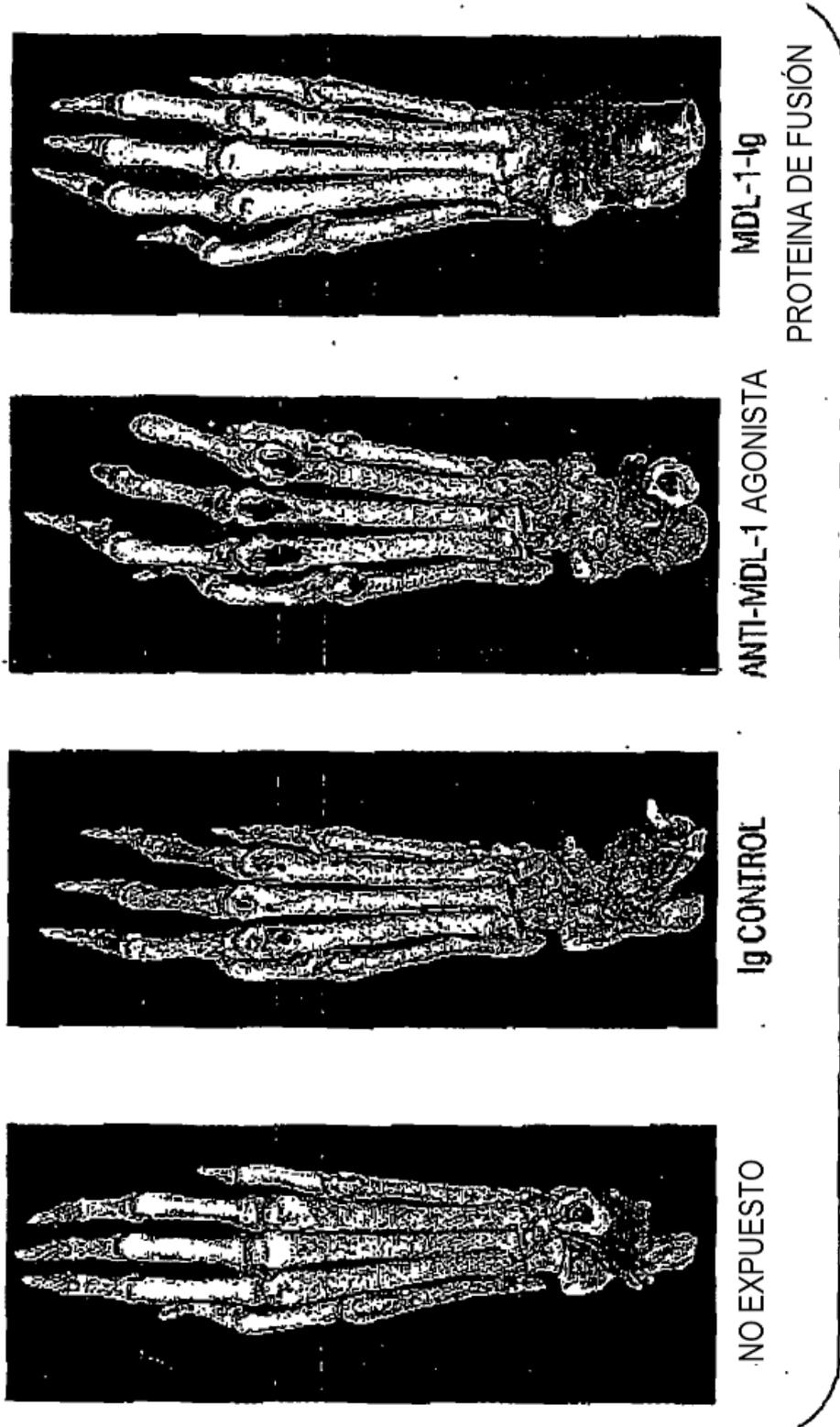


FIG. 7

ES 2 540 854 T3

HUESO Y CARTÍLAGO	FUNCIÓN	NO EXPUESTO	CONTROL Ig	α MDL1	MDL1 IgFP
DESARROLLO/DIFERENCIACIÓN DE OSTEOCLASTOS					
TNF	Promueve los precursores de osteoclastos en médula ósea	8	6	4	1
IL6	Promueve la osteoclastogénesis	4	7	41	1
RANKL	Expresado por las células del estroma y sinoviales para regular la formación de osteoclastos	21	91	390	66
OPG/TNFSF11b	Regulador negativo de la formación de osteoclastos	24	66	24	58
Bglap2/OSTEOCALCINA	Estimula la diferenciación de osteoblastos e inhibe la formación de osteoclastos	1239	4242	1823	7658
EXPRESIÓN/RESORCIÓN DE OSTEOCLASTOS					
TRAP	Marcador de osteoclastos-fosfatasa ácida resistente a tartrato	130	432	1755	173
RANK	Expresado en osteoclastos activados	21	25	43	20
MMP3	Presente en fosas de resorción	252	833	3763	341
MMP9	Regulación hacia arriba, con diferenciación y activación de osteoclastos	378	565	2562	178
ATP6VOD2	Actividad de proteasa de ATPasa, KO osteoperosis	132	154	880	64
SOCS3	Regulado hacia arriba en osteoclastos inducidos por RANKL y sus precursores	795	1172	4991	655
TIMP1	Actividad enzimática en OA	1089	3019	9056	1815
CTSK	Proteasa clave en resorción ósea osteoclástica impulsada por RANKL	1853	2574	6938	1430
MIGRACIÓN CELULAR					
MMP13	Proteasa osteoblástica en cartílago hipertrófico/sinovio OA	889	1851	5275	704
SDF-1	Expresado sobre hueso y cartílago	28	38	57	15
VCAM	Expresado en células vasculares y endoteliales	554	584	1295	451

Fig. 8

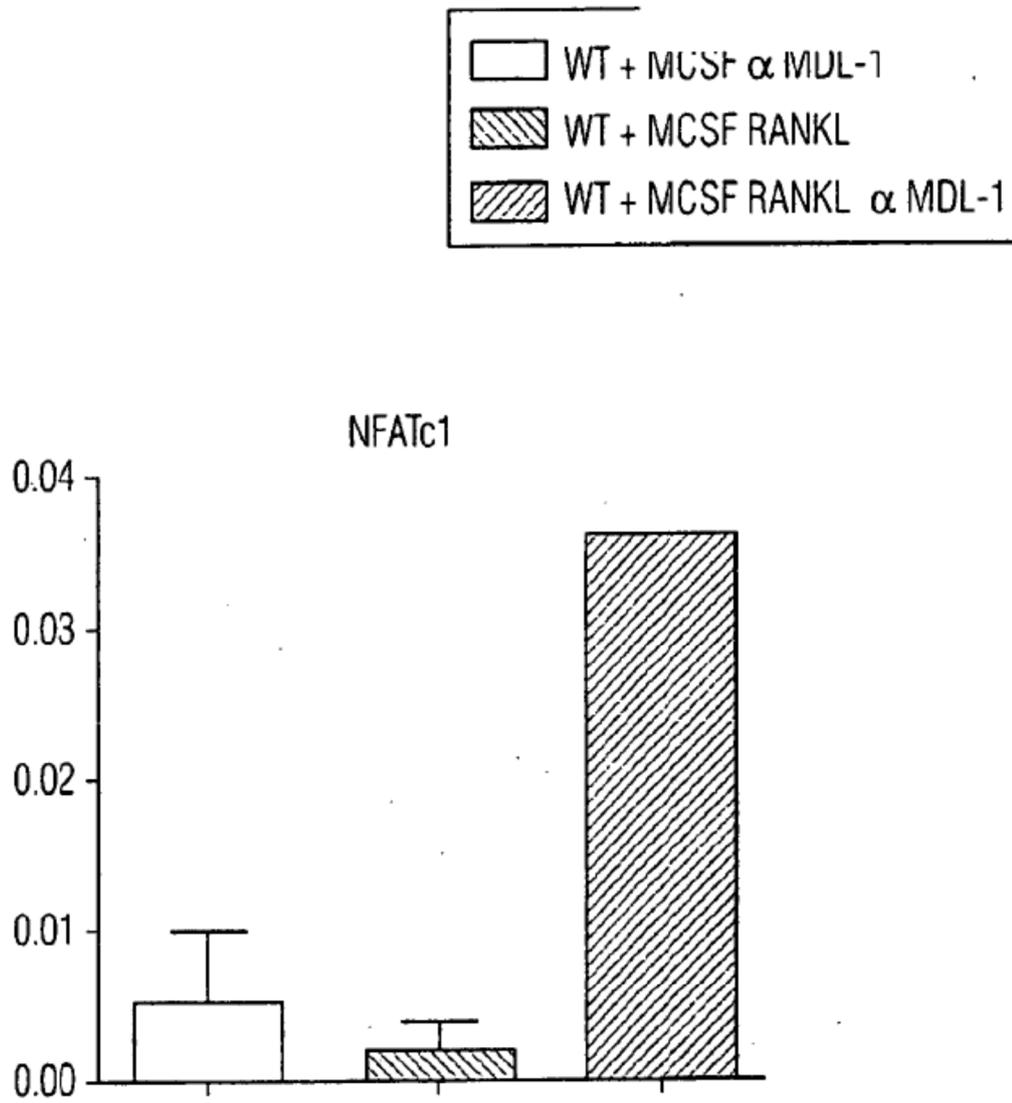


FIG. 9