

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 006**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2010 PCT/US2010/032373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10124276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10767880 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2421559**

54 Título: **Anticuerpos anti-TGF-beta para la inducción del crecimiento óseo**

30 Prioridad:

24.04.2009 US 172539 P

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

24.01.2017

73 Titular/es:

**VANDERBILT UNIVERSITY (100.0%)
305 Kirkland Hall, 2201 West End Avenue
Nashville, TN 37240, US**

72 Inventor/es:

**EDWARDS, JAMES R.;
MUNDY, GREGORY R. y
BISWAS, SWATI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 598 006 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

Anticuerpos anti-TGF-beta para la inducción del crecimiento óseo

5 **Antecedentes de la invención****I. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a los campos de la biología molecular y la medicina. Más en particular, se refiere a los campos de enfermedades y lesiones de huesos, reparación de huesos, implantes óseos, injertos óseos, enfermedades periodontales y cáncer. Específicamente, trata de anticuerpos dirigidos contra TGF- β en el uso para estimular la formación y el crecimiento del hueso, para aumentar la masa y la resistencia óseas y, por tanto, para tratar enfermedades óseas tales como la osteoporosis, así como el traumatismo óseo.

15 **II. Técnica relacionada**

Aproximadamente 200 millones de personas en todo el mundo padecen trastornos óseos tales como osteoporosis, fracturas óseas y enfermedades periodontales (encías) (en donde el diente se desprende del hueso circundante). La osteoporosis representa un problema de atención sanitaria importante y en rápido crecimiento con una necesidad médica no satisfecha de los tratamientos que estimulen la formación del hueso. La mayoría de fármacos actuales para la osteoporosis retrasan la degradación del hueso, pero no estimulan la formación ósea para sustituir el hueso ya perdido. Los compuestos que estimulan la formación ósea representan de esta manera una necesidad no satisfecha en el área de las enfermedades de huesos. Se sabe que la osteoporosis afecta aproximadamente a 100 millones de personas en todo el mundo -35 millones de las cuales viven en Estados Unidos, Europa occidental y 20 Japón. Además, aproximadamente 25 millones de individuos sufren fracturas de huesos anualmente, 60 millones tienen enfermedades periodontales (en las que los dientes se desprenden de la mandíbula), y otros 18 millones tienen otras enfermedades tales como cáncer de hueso.

Los tratamientos más usuales para los pacientes con osteoporosis se centran en la prevención de la pérdida del hueso, no en la formación de hueso. Esto sigue siendo una importante consideración ya que una morbilidad y mortalidad significativas se asocian con el reposo prolongado en cama de personas mayores que se produce tras una fractura de hueso, particularmente, en aquellas personas que han sufrido fracturas de cadera. Las complicaciones debidas al reposo en cama incluyen coágulos y neumonía. Estas complicaciones son reconocidas y se toman usualmente medidas para evitarlas, pero estas son apenas el mejor enfoque al tratamiento.

Otro problema de salud adicional relacionado con los huesos es la reconstrucción ósea y, específicamente, la capacidad de reconstruir defectos en el tejido óseo que son resultado de una lesión traumática, como consecuencia del cáncer o de la cirugía contra el cáncer, o como resultado de un defecto congénito, o como resultado del envejecimiento. Existe una necesidad significativa de implantes ortopédicos más frecuentes, y los huesos craneales y faciales son dianas concretas para este tipo de necesidades reconstructivas. La disponibilidad de nuevos materiales de implante, por ejemplo, titanio, ha permitido la reparación de defectos relativamente grandes. Los implantes de titanio proporcionan excelente estabilidad temporal en los defectos óseos. Sin embargo, la experiencia ha mostrado que la carencia de hueso viable para salvar el defecto puede dar como resultado la exposición del aparato, infección, inestabilidad estructural y, finalmente, al fracaso en la reparación del defecto.

Los injertos de hueso autólogos son otra posibilidad para hacer frente a la lesión ósea, pero tienen algunas desventajas demostradas porque deben extraerse de algún sitio del donante tal como la cresta ilíaca o una costilla, normalmente esto proporciona una cantidad de hueso insuficiente para rellenar completamente el defecto y el hueso que se forma es algunas veces propenso a la infección y a la resorción. Las preparaciones xenogénicas parcialmente purificadas no son prácticas para el uso clínico debido a que a partir de kilogramos de hueso de bovino solo se purifican cantidades en microgramos, haciendo que la producción comercial a gran escala sea costosa e impracticable. Se emplean a menudo por tanto aloinjertos y preparaciones de huesos desmineralizados. Las transferencias microquirúrgicas de injertos de huesos libres con tejido blando y vasos sanguíneos unidos pueden cerrar defectos óseos y permiten una fuente inmediata de suministro de sangre al injerto. Sin embargo, estas técnicas que requieren mucho tiempo, han mostrado producir una gran cantidad de morbilidad, y pueden utilizarse solo por individuos especialmente preparados.

Otra forma de enfermedad ósea es la resultante del cáncer. Numerosos cánceres metastatizan al hueso y pueden dar como resultado el debilitamiento del hueso, y algunos se asocian incluso a su destrucción del hueso y pérdida, tal como cáncer de mama, pulmón, tiroides, riñón y próstata. Además, el mieloma múltiple y su enfermedad ósea asociada a mieloma (MBD) no es un cáncer metastático. En su lugar, las células de mieloma se derivan de linfocitos B del sistema inmunitario que residen normalmente en la médula ósea y están por tanto íntimamente asociados con el hueso. De hecho, el microentorno de la médula ósea juega un importante papel en el crecimiento, la supervivencia y la resistencia a la quimioterapia de las células de mieloma, que, a su vez, regula la pérdida de hueso aumentada asociada con este trastorno (página web en multiplemyeloma.org). Aproximadamente el 90 % de los pacientes con mieloma tienen implicaciones óseas, comparado con el 40-60 % de los pacientes con cáncer que tienen metástasis

ósea, y aproximadamente el 80 % de estos pacientes con MBD tienen un dolor de huesos intratable. Adicionalmente, aproximadamente un 30 % de los pacientes de mieloma tienen hipercalcemia, que es un resultado de la actividad osteolítica aumentada asociada con esta enfermedad (Cavo *et al.*, 2006).

5 A diferencia de la osteolisis asociada con otros tumores óseos, las lesiones de MBD son únicas ya que no sanan ni se reparan, a pesar de que los pacientes lleven muchos años de remisión completa (página web en multiplemyeloma.org; Terpos *et al.*, 2005). Mecanicistamente, esto parece estar relacionado con la inhibición y/o la
10 osteoblástica están aumentadas, pero equilibradas al principio de la enfermedad, mientras que la MBD abierta muestra actividad osteoclástica alta y baja actividad osteoblástica (página web en multiplemyeloma.org). Por lo tanto, la MBD es un trastorno en el que la formación de hueso y la pérdida de hueso están desacopladas y se beneficiarían de tratamientos que estimulen la formación de hueso y el retraso de su pérdida. Hasta la fecha, no
15 existen dichos tratamientos. Por lo tanto, sigue existiendo necesidad de métodos mejorados de estimulación de la formación de hueso y de aumento de la resistencia del hueso *in vivo* para tratar las enfermedades y las lesiones de huesos, incluyendo cáncer.

Los documentos US 2006/0015952 divulgan el uso de anticuerpos dirigidos contra TGF-beta neutralizantes para preservar la destrucción del hueso y la pérdida del hueso, y detener o retrasar los procesos patológicos de
20 destrucción o pérdida de hueso. El documento US 2006/0015952 está limitado al campo del cáncer y al tratamiento del cáncer.

Mooney *et al.* (Journal of craniofacial surgery, vol. 18, nº 2, pág. 336-346) divulga que el tratamiento con anticuerpos dirigidos a TGFbeta2 aumenta el volumen y el crecimiento del cráneo.

25

Sumario de la invención

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo que se une inmunológicamente a
30 TGF-β para su uso en un método para aumentar la masa ósea y el volumen óseo y/o aumentar el crecimiento del hueso y/o la resistencia del hueso en un sujeto, en donde dicho sujeto padece osteoporosis, fractura ósea, pérdida de hueso debida a traumatismo, o enfermedad de Paget, en donde el sujeto no tiene cáncer y en donde el anticuerpo se une a las tres isoformas de TGF-β. El anticuerpo puede designarse como 1D11, y puede ser una versión humanizada de 1D11, o cualquier versión genomanipulada que contenga las CDR de 1D11 en un marco heterólogo.

35 En realizaciones, el anticuerpo dirigido contra TGF-β se une especialmente a al menos: (a) TGF-β1, TGF-β2, y TGF-β3 (denominado también "anticuerpo pan-neutralizante"). En varias realizaciones, la constante de afinidad K_a del anticuerpo dirigido contra TGF-β para al menos una isoforma de TGF-β, que se une específicamente, es preferentemente mayor de $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, o $10^{12} M^{-1}$. En otras realizaciones
40 adicionales, el anticuerpo de la invención se une específicamente a una proteína sustancialmente idéntica a la TGF-β1, TGF-β2, y/o TGF-β3 humanas. Contempladas también para su uso en seres humanos están las formas quiméricas y humanizadas y los derivados de anticuerpos no humanos. La producción de dichas variantes está también comprendida entre los conocimientos normales de una persona experta en la materia (véase, por ejemplo, Antibody Engineering, ed., Borrebaeck, 2ª ed., Oxford University Press, 1995).

45 En una realización, el anticuerpo dirigido contra TGF-β es un anticuerpo monoclonal de murino 1D11 producido mediante el hibridoma 1D11.16 (n.º de depósito ATCC HB 9849, también descrito en las patentes de Estados Unidos. 5.571.714, 5.772.998 y 5.783.185). El anticuerpo 1D11 se une específicamente a las tres isoformas de TGF-β de mamíferos. La secuencia de la región variable de la cadena pesada de 1D11 está disponible con el n.º de registro AAB46787. En realizaciones relacionadas, el anticuerpo dirigido contra TGF-β es un derivado de 1D11, por
50 ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias CDR idénticas a las de 1D11 (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o con la CDR injertada). En otra realización adicional, el anticuerpo dirigido contra TGF-β es un anticuerpo recombinante completamente humano.

55 El anticuerpo puede administrarse a dicho sujeto sistémicamente, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica. El anticuerpo se puede administrar en un sitio diana del hueso, incluyendo la inyección en el sitio. El anticuerpo puede también estar comprendido en un dispositivo de liberación temporal implantado en el sitio.

60 El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano, tal como un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono o una vaca. El método puede comprender además al menos una segunda administración de dicho anticuerpo, incluyendo regímenes de tres administraciones por semana. El sujeto puede recibir al menos 9 administraciones. El método puede comprender además evaluar la masa ósea tras la administración de dicho anticuerpo, tal como mediante obtención de imágenes óseas.

65 Se divulga también en el presente documento:

- un método para aumentar el número de osteoblastos en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- β ;
- un método que comprende disminuir el número de osteoclastos en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- β ;
- 5 • un método para aumentar la resistencia del hueso en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- β ; y
- un método para disminuir la señalización del TGF- β en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- β .

10 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

FIG. 1 - Régimen de tratamiento. Se trataron por vía intraperitoneal ratones C57B1/6 ($n = 5$) con 1D11 o anticuerpo control (13C4) 3 veces/semana durante 28 días. Se determinaron los parámetros esqueléticos mediante digitalización con μ CT, análisis histomorfométrico y ensayo bioquímico. Se determinaron también los efectos del tratamiento con anticuerpos dirigidos contra TGF- β sobre la distribución y la expresión del gen/proteína.

FIGS. 2A-F - el tratamiento con 1D11 aumenta el volumen óseo. Imágenes de renderizado tridimensional procedentes de regiones digitalizadas con μ CT de metafisis de la tibia ($200 \mu\text{m}$) mostraron un volumen óseo aumentado en ratones tratados con 1D11 (FIGS. 2A-B), acompañado por un aumento de BV/TV (FIG. 2C) y BMD (FIG. 2D). También se observó un engrosamiento de las trabéculas (FIG. 2E), y una disminución en la separación trabecular en esta región en los animales tratados con 1D11 (FIG. 2F; * = $p < 0,05$).

FIGS. 3A-B - Análisis histomorfométrico. Las secciones tisulares de vértebras lumbares descalcificadas de animales tratados con 1D11 mostraron un significativo aumento en BV/TV y cambios positivos en los parámetros trabeculares, en comparación con los animales del control (FIG. 3A, Von Kossa/Van Gieson, * = $p < 0,05$). El volumen óseo largo aumentó de forma importante (FIG. 3B, H y E).

FIGS. 4A-D - Distribución celular de osteocitos después del **tratamiento** con 1D11. Secciones tibiales descalcificadas teñidas para TRAP mostraron una considerable disminución en los osteoclastos teñidos positivamente que revisten la superficie del hueso trabecular en comparación con los controles (FIG. 4A, aumento inicial x4; FIG. 4B, aumento inicial x20; flechas negras = osteoclastos). Se cuantificó la distribución celular mediante el análisis morfométrico de las secciones teñidas con H y E y TRAP, y demostró una disminución significativa en el número de osteoclastos y la superficie sobre el hueso de los ratones tratados con 1D11 (FIG. 4C, ** $p < 0,01$). El número de osteoclastos se elevó significativamente en ratones tratados con el anticuerpo 1D11 (FIG. 4D, * $p < 0,05$).

FIG. 5 · Ensayo biomecánico. Se examinaron biomecánicamente fémures recientemente disecados procedentes de ratones tratados con 1D11 o ratones del control mediante flexión de 3 puntos. Los fémures se situaron horizontalmente y se cargaron monotónicamente a una velocidad de 3 mm/min en la diáfisis media. El tratamiento con 1D11 aumentó significativamente la resistencia a la flexión, el límite elástico y el módulo del tejido (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

45 Descripción detallada de la invención

TGF- β es una proteína de la matriz ósea abundante que afecta la formación, la función y las interacciones célula-célula de osteoblastos y osteoclastos, para controlar la remodelación del hueso y mantener una masa ósea adecuada. De este modo, la ruta de señalización de TGF- β representa una única diana farmacológica, con el potencial para regular el volumen y la calidad del hueso mediante el control de osteoblastos y osteoclastos. Los estudios previos utilizando modelos murinos que contienen modificaciones genéticas en la ruta de señalización de TGF- β han mostrado que la señalización reducida de TGF- β potencia las propiedades mecánicas y la concentración de minerales de la matriz ósea, así como la masa ósea. Aunque los inhibidores de moléculas pequeñas de la señalización de TGF- β han mostrado disminuir el crecimiento y la invasividad del cáncer, no se ha resuelto completamente el efecto directo del bloqueo de TGF- β sobre el entorno de la médula ósea normal en ratones que no soportan tumores.

Por lo tanto, los inventores examinaron la capacidad de un anticuerpo generado contra TGF- β de bloquear las rutas de señalización de TGF- β . Este anticuerpo reguló positivamente el número de osteoblastos, aunque disminuyó simultáneamente la cantidad de osteoclastos activos en la médula. Esto dio como resultado un importante aumento en el volumen y la calidad del hueso. Estos hallazgos ilustran claramente el potencial de los compuestos que pueden dirigir específicamente la ruta de señalización de TGF- β *in vivo*, y sugiere una solución terapéutica para aumentar la masa y la resistencia óseas. Estos y otros aspectos de la invención se muestran en detalle a continuación.

65

I. Anticuerpo dirigido contra TGF-β

A. TGF-β

5 El factor β de crecimiento transformante (TGF-β) controla la proliferación, la diferenciación celular y otras funciones en la mayoría de las células. Actúa sobre la inmunidad, el cáncer, la cardiopatía, la diabetes, y el síndrome de Marfan. El TGF-β actúa como un factor antiproliferativo en células epiteliales normales y en los estadios iniciales de la oncogénesis. Algunas células secretan TGF-β, y tienen también receptores del TGF-β. Esto se conoce como una señalización autocrina. Las células cancerosas aumentan su producción de TGF-β, que actúa también sobre las
10 células circundantes.

TGF-β es una proteína secretada que existe en tres isoformas, denominadas TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. Este era también el nombre original de TGF-β1, que fue el miembro fundador de esta familia. La familia de TGF-β forma parte de una superfamilia de proteínas conocida como la superfamilia del factor beta de crecimiento transformante, que
15 incluye inhibinas, activina, la hormona antimülleriana, la proteína morfogenética ósea, decapentaplégica y Vg-1.

Las estructuras peptídicas de los tres miembros de la familia TGF-β son muy similares. Todas están codificadas como precursores de proteínas grandes; TGF-β1 contiene 390 aminoácidos y TGF-β2 y TGF-β3 contienen, cada una, 412 aminoácidos. Tienen cada una un péptido de señalización en el extremo N de 20-30 aminoácidos que es necesario para la secreción desde una célula, una proregión (denominada péptido asociado a latencia o LAP), y una región en el extremo C de 112-114 aminoácidos que se convierte en la molécula TGF-β madura tras su liberación de la proregión mediante escisión proteolítica. La proteína TGF-β madura dimeriza para producir una molécula activa de 25 KDa con muchos motivos estructurales conservados. TGF-β tiene nueve restos de cisteína que están conservados entre su familia; ocho forman enlaces disulfuro en la molécula para crear una estructura de nudo de cisteína característica de la superfamilia de TGF-β mientras que las nueve cisteínas forman un enlace con las nueve cisteínas de otra molécula de TGF-β para producir el dímero. Se cree que muchos otros restos conservados en TGF-β forman una estructura secundaria mediante interacciones hidrófobas. La región entre la quinta y la sexta cisteínas conservadas aloja el área más divergente de las moléculas de TGF-β que se expone a la superficie de la molécula y está implicada en la unión y especificidad del receptor de TGF-β.
20
25
30

TGF-β induce la apoptosis en numerosos tipos de células. TGF-β puede inducir la apoptosis de dos maneras: mediante la ruta SMAD o la ruta DAXX. La ruta SMAD es la ruta de señalización consensuada que los miembros de la familia TGF-β utilizan para la señalización. En esta ruta, los dímeros de TGF-β se unen a un receptor de tipo II que identifica y fosforila un receptor de tipo I. El receptor de tipo I identifica y fosforila a continuación un receptor regulado por SMAD (R-SMAD). SMAD3, y RSMAD, que se ha implicado en la inducción de la apoptosis. El R-SMAD se une a continuación al SMAD común (coSMAD) SMAD4 y forma un complejo heterodimérico. Este complejo entra a continuación en el núcleo de la célula donde actúa como factor de transcripción de diversos genes, incluyendo los que activan la ruta de la proteína quinasa 8 activada por mitógeno, que estimula la apoptosis. TGF-β puede estimular también la apoptosis mediante la proteína 6 asociada a muerte (proteína adaptadora DAXX). Se ha mostrado que DAXX se asocia y se une a la quinasa receptora de TGF-β de tipo II. Se cree que TGF-β es importante en la regulación del sistema inmunitario por los linfocitos CD25+ reguladores. TGF-β parece bloquear la activación de los linfocitos y los monocitos derivados de fagocitos.
35
40

B. Anticuerpos

Métodos de producción.

La presente invención se refiere a un anticuerpo que es inmunorreactivo con las tres isoformas de TGF-β.

50 El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, pero podría también emplearse el uso de una preparación de anticuerpos policlonales con la misma especificidad por TGFβ1-3. Son bien conocidos en la técnica los medios para preparar y caracterizar anticuerpos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

En resumen, se preparan anticuerpos policlonales inmunizando un animal con un inmunógeno (es decir, TGF-β o uno de sus fragmentos) y recogiendo el antisuero de los animales inmunizados. Se puede usar un amplio intervalo de especies animales para la producción del antisuero. Normalmente, un animal utilizado para la producción de antisuero es un animal no humano incluyendo conejos, ratones, ratas, hámsteres, cerdos o caballos. Debido al volumen relativamente grande de sangre de conejos, se prefiere seleccionar un conejo para la producción de anticuerpos policlonales.
55
60

Como es bien sabido en la técnica, una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. Resulta a menudo necesario por tanto reforzar el sistema inmunitario del hospedador, lo que se puede conseguir acoplado un péptido o un polipéptido inmunógeno a un transportador. Los transportadores ilustrativos y preferidos son la hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). Otras albúminas tales como ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo se pueden usar también como transportadores. Son bien conocidos en la técnica los medios para conjugar un polipéptido con una proteína transportadora e incluyen glutaraldehído, éster de
65

m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

5 Como también es bien sabido en la técnica, la inmunogenicidad de una composición inmunógena concreta puede potenciarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes ilustrativos y preferidos incluyen el adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerto), adyuvantes incompletos de Freund y un adyuvante de hidróxido de aluminio.

10 La cantidad de composición inmunógena utilizada en la producción de anticuerpos policlonales varía dependiendo de la naturaleza del inmunógeno, así como del animal utilizado para la inmunización. Se puede usar varias rutas para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). Puede vigilarse la producción de anticuerpos policlonales realizando un muestreo de la sangre de los animales inmunizados en diversos momentos después de la inmunización. Se puede proporcionar también una segunda inyección de refuerzo. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta que se consigue un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, se puede extraer sangre del animal inmunizado y aislarse y almacenarse el suero, y/o el animal se puede usar para generar los mAb.

15 Los mAb pueden prepararse fácilmente mediante el uso de técnicas bien conocidas, tales como las ilustradas en la patente de Estados Unidos 4.196.265. Normalmente, esta técnica implica inmunizar un animal adecuado con una composición inmunógena seleccionada, es decir, una proteína TGF- β purificada o parcialmente purificada, o un polipéptido o péptido o célula que expresa altos niveles de TGF- β . La composición inmunizante se administra de una manera eficaz para estimular las células que producen anticuerpos. Los roedores tales como ratones y ratas son animales preferidos, sin embargo, es también posible el uso de células de conejo, oveja y rana. El uso de ratas puede proporcionar determinadas ventajas (Goding, 1986), pero se prefieren ratones, siendo el más preferido el ratón BALB/c, que se usa de forma más rutinaria y proporciona generalmente un mayor porcentaje de fusiones estables.

20 Tras la inmunización, las células somáticas con potencial para producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B), se seleccionan para su uso en el protocolo de generación de mAb. Estas células pueden obtenerse de bazo que se han sometido a biopsia, amígdalas o ganglios linfáticos, o de una muestra de sangre periférica. Se prefieren esplenocitos y células de sangre periférica, los primeros porque son una fuente rica de células productoras de anticuerpos que están en un estadio de plasmablasto en división, y los segundos porque la sangre periférica es fácilmente accesible. A menudo, habrá de inmunizarse un panel de animales y se retirará el bazo del animal con el título de anticuerpo más alto y se obtendrán los linfocitos del bazo homogeneizando el bazo con una jeringuilla. Normalmente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente de 5×10^7 a 2×10^8 linfocitos.

30 A continuación, los linfocitos B productores de anticuerpos procedentes del animal inmunizado se fusionan con células de mieloma inmortales, generalmente de la misma especie que el animal que se inmunizó. Las líneas de células de mieloma adecuadas para su uso en los procedimientos de fusión de producción de hibridomas preferentemente no producen anticuerpos, tienen una elevada eficacia de fusión, y deficiencias enzimáticas que las convierten, entonces, en incapaces de crecer en determinados medios selectivos que soportan el crecimiento solo de las células fusionadas deseadas (hibridomas).

45 Se puede usar una cualquiera de numerosas células de mieloma, como se conocen por los expertos en la materia (Goding, 1986; Campbell, 1984). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se puede usar P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas, se puede usar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6 son también útiles para las fusiones celulares.

50 Los métodos para generar híbridos de esplenocitos o células de ganglios linfáticos y células de mieloma productoras de anticuerpo comprenden usualmente mezclar células somáticas con células de mieloma en una relación 2:1, aunque la relación puede variar de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químico o eléctrico) que promueve la fusión de las membranas celulares. Se han descrito métodos de fusión que utilizan virus Sendai (Kohler y Milstein, 1975; 1976), y los que utilizan polietilenglicol (PEG), tales como PEG al 37 % (v/v), de Geffer *et al.* (1977). Es también adecuado el uso de métodos de fusión inducidos eléctricamente (Goding, 1986).

60 Los procedimientos de fusión producen usualmente híbridos a frecuencias bajas, alrededor de 1×10^{-6} a 1×10^{-8} . Sin embargo, esto no plantea un problema, ya que los híbridos fusionados viables se diferencian de las células sin fusionar progenitoras, (particularmente de las células de mieloma sin fusionar que continuarían normalmente dividiéndose indefinidamente) cultivándolas en un medio selectivo. El medio selectivo es generalmente aquel que contiene un agente que bloquea la síntesis *de novo* de los nucleótidos en el medio de cultivo de tejido. Los agentes ilustrativos y preferidos son aminopterina, metotrexato, y azaserina. Aminopterina y metotrexato bloquean la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, mientras que azaserina bloquea solamente la síntesis de purina. Cuando se usa aminopterina o metotrexato, el medio está suplementado con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se usa azaserina, el medio está suplementado con hipoxantina.

El medio de selección preferido es HAT. Solo las células que pueden hacer funcionar rutas no modificadas de nucleótidos son capaces de sobrevivir en medio HAT. Las células de mieloma son defectivas en las enzimas clave de la ruta no modificada, por ejemplo, hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), y no pueden sobrevivir. Los linfocitos B pueden hacer funcionar esta ruta, pero tienen una duración de la vida limitada en el cultivo y mueren generalmente en aproximadamente dos semanas. Por lo tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son aquellos híbridos formados a partir de células de mieloma y linfocitos B.

Este cultivo proporciona una proporción de hibridomas a partir de la cual se seleccionan hibridomas específicos. Normalmente, la selección de hibridomas se lleva a cabo cultivando las células mediante dilución de clones individuales en placas de microtitulación, seguido por el ensayo de los sobrenadantes clónicos individuales (después de aproximadamente dos a tres semanas) para la reactividad deseada. El ensayo debe ser sensible, sencillo y rápido, tal como radioinmunoensayos, enzimoimmunoensayos, ensayos de citotoxicidad, ensayos de placas, ensayos de inmunotransferencia, y similares.

Los hibridomas seleccionados podrían a continuación diluirse y clonarse en serie en líneas de células individuales productoras de anticuerpos, cuyos clones pueden a continuación propagarse indefinidamente para proporcionar los mAb. Las líneas celulares pueden aprovecharse para la producción de mAb de dos maneras básicas. Una muestra del hibridoma puede inyectarse (a menudo en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo utilizado para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por la célula híbrida fusionada. Los fluidos corporales del animal, tales como suero y fluido ascítico, se pueden aprovechar a continuación para proporcionar los mAb a alta concentración. Las líneas celulares individuales podrían también cultivarse *in vitro*, donde los mAb se secretan naturalmente en el medio de cultivo a partir del cual se obtienen fácilmente en altas concentraciones. Los mAb producidos por cualquier medio pueden purificarse adicionalmente, si se desea, utilizando métodos de filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

Anticuerpos modificados. En una realización, las moléculas de anticuerpos comprenderán fragmentos (tales como F(ab'), F(ab')₂) que se producen, por ejemplo, por la escisión proteolítica de los mAb, o las inmunoglobulinas monocatenarias que se pueden producir, por ejemplo, mediante medios recombinantes. Dichos derivados de anticuerpos son monovalentes. En una realización, dichos fragmentos pueden combinarse entre sí, o con otros fragmentos de anticuerpos o ligandos de receptores para formar moléculas de unión "quiméricas". De forma significativa, dichas moléculas quiméricas pueden contener sustituyentes capaces de unirse a diferentes epítopos de la misma molécula.

Puede ser deseable "humanizar" los anticuerpos producidos en hospedadores no humanos para atenuar cualquier reacción inmunitaria cuando se usa en tratamiento humano. Dichos anticuerpos humanizados pueden estudiarse en un contexto *in vitro* o en un contexto *in vivo*. Pueden producirse anticuerpos humanizados sustituyendo, por ejemplo, una parte inmunógena de un anticuerpo con una parte correspondiente, pero no inmunógena (es decir, anticuerpos quiméricos). Solicitud PCT PCT/US86/02269; solicitud EP 184.187; solicitud EP 171.496; solicitud EP 173.494; solicitud PCT N° WO 86/01533; solicitud EP 125.023; Sun *et al.* (1987); Wood *et al.* (1985); y Shaw *et al.* (1988). Se proporcionan revisiones de anticuerpos quiméricos "humanizados" por Morrison (1985). "Humanized" antibodies can alternatively be produced by CDR or CEA substitution. Jones *et al.* (1986); Verhoeyan *et al.* (1988); Beidler *et al.* (1988).

En realizaciones más específicas, se pueden usar las regiones CDR del anticuerpo 1D11 y colocar estas en las regiones marco de cualquier otro anticuerpo adecuado, humano o no humano. El anticuerpo 1D11 dirigido contra TGF-β es un anticuerpo monoclonal de murino producido por el hibridoma 1D11.16 (ATCC N.º de registro HB 9849, se describen también en las Patentes de Estados Unidos. 5.571.714, 5.772.998 y 5.783.185). El anticuerpo 1D11 se une específicamente a las tres isoformas de TGF-β de mamíferos. La secuencia de la región variable de la cadena pesada de 1D11 está disponible con el n.º de registro AAB46787.

En realizaciones relacionadas, el anticuerpo dirigido contra TGF-β es un derivado de 1D11, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias CDR idénticas a las de 1D11 (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o injertado a la CDR). En otra realización adicional, el anticuerpo dirigido contra TGF-β es un anticuerpo recombinante completamente humano.

II. Estructura y fisiología ósea

El hueso es un tejido vivo, en crecimiento. Es poroso y está mineralizado, y constituido por células, vasos, matriz orgánica y cristales de hidroxiapatito inorgánicos. El esqueleto humano está realmente constituido por 2 tipos de huesos: el hueso cortical y el hueso trabecular. El hueso cortical representa cerca del 80 % de la masa del esqueleto. El hueso cortical tiene una tasa de renovación lenta y una resistencia alta a la flexión y a la torsión. Proporciona resistencia cuando la flexión puede ser indeseable, como en la parte intermedia de los huesos largos. El hueso trabecular representa solamente el 20 % de la masa del esqueleto, pero comprende el 80 % de la superficie ósea. Es menos denso, más elástico y tiene mayor tasa de renovación que el hueso cortical.

A. Células formadoras de hueso

Precursores óseos. Las células precursoras de hueso humanas se caracterizan como células de pequeñas dimensiones que expresan cantidades bajas de proteínas óseas (osteocalcina, osteonectina, y fosfatasa alcalina) y tienen un grado bajo de complejidad interna (Long *et al.*, 1995). Cuando se estimulan para diferenciarse, estas células proteoblásticas se convierten en osteoblastos por su aspecto, tamaño, expresión antigénica, y estructura interna. Aunque estas células están normalmente presentes en frecuencias muy bajas en la médula ósea, se ha descrito un proceso para aislar estas células (Long *et al.*, 1995). La patente de EE.UU. 5.972.703 describe métodos para aislar y utilizar las células precursoras de huesos.

Numerosos estudios indican que las células derivadas de médula ósea tienen potencial osteogénico. La mayoría de estas investigaciones apuntan que los citoblastos del mesénquima (MSC) experimentan diferenciación a osteoblastos cuando se cultivan en presencia de citoquinas activas en hueso (Jaiswal *et al.*, 2000; Phinney *et al.*, 1999; Aubin, 1998; Zohar *et al.*, 1997). Los citoblastos del mesénquima son una población pluripotente capaz de generar múltiples linajes de células estromales. Las MSC, como se utilizan actualmente, son una población heterogénea de células aisladas mediante adherencia a plástico, y se propagan mediante pases de baja densidad. No obstante, una reciente publicación indica la naturaleza clónica de los resultados del destino celular en MSC indicando que una única célula MSC puede proporcionar un dos o tres linajes mesenquimales, uno de los cuales es usualmente de células de hueso (Pittenger *et al.*, 1999). Estos estudios son consistentes con informes anteriores que demostraban el potencial osteogénico de las células estromales de médula ósea, en particular las denominadas UFC-f procedentes de ratones y seres humanos (Friedenstein *et al.*, 1968; Reddi y Huggins, 1972; Friedenstein *et al.*, 1982; Ashton *et al.*, 1985; Bleiberg, 1985; Gronthos *et al.*, 1994; Gronthos *et al.*, 1999).

El aislamiento de células individuales de MSC humanas generó clones que expresan el mismo fenotipo superficial que las MSC sin fraccionar (Pittenger *et al.*, 1999). De manera interesante, de los 6 clones de MSC evaluados, 2 retuvieron el potencial osteogénico, condriogénico, y adipogénico; otros eran bipotentes (tanto con potencial osteogénico más condriogénico, o potencial osteoadipocítico) o eran monolinaje (condrocitos). Esto sugiere que las propias MSC son de naturaleza heterogénea en la naturaleza (aunque las condiciones de cultivo pueden también haber conducido a la pérdida del linaje potencial). Hasta la fecha, la capacidad de autorrenovación de las MSC sigue sin estar clara. No obstante, estos estudios *in vitro* y otros estudios *in vivo* (Kadiyala *et al.*, 1997; Petite *et al.*, 2000; Krebsbach *et al.*, 1999) muestran que las MSC puede asignar al hueso un linaje celular y desarrollarlo hasta el estado de mineralización de la matriz *in vitro*, o la formación del hueso *in vivo*.

Preosteoblastos. Los preosteoblastos son intermedios entre células osteoprogenitoras y osteoblastos. Muestran una creciente expresión de marcadores fenotípicos óseos tales como la fosfatasa alcalina (Kale *et al.*, 2000). Tienen una capacidad proliferativa más limitada, pero sin embargo continúan dividiéndose y produciendo más preosteoblastos u osteoblastos.

Osteoblastos. Un osteoblasto es una célula mononucleada que es responsable de la formación del hueso. Los osteoblastos producen osteoide, que está compuesto principalmente de colágeno de tipo I. Los osteoblastos son también responsables de la mineralización de la matriz osteoide. El hueso es un tejido dinámico que constantemente está siendo reconfigurado por los osteoblastos, que construyen el hueso, y los osteoclastos, que resorben el hueso. Los osteoblastos tienden a disminuir en número y actividad a medida que los individuos envejecen, disminuyendo de esta manera la renovación natural del tejido óseo.

Los osteoblastos surgen de células osteoprogenitoras localizadas en el periostio y la médula ósea. Los osteoprogenitores son células progenitoras inmaduras que expresan el factor de transcripción regulador maestro Cbfa1/Runx2. Los osteoprogenitores se inducen para diferenciarse bajo la influencia de factores de crecimiento, en particular, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Además de las BMP, otros factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor β de crecimiento transformante (TGF- β), pueden promover la división de los osteoprogenitores y aumentar potencialmente la osteogénesis. Una vez que los osteoprogenitores comienzan a diferenciarse en osteoblastos, comienzan a expresar varios marcadores genéticos que incluyen Osterix, Col1, ALP, osteocalcina, osteopontina, y osteonectina. Aunque el término osteoblasto implica un tipo de célula inmadura, los osteoblastos son, de hecho, las células óseas maduras enteramente responsables de generar tejido óseo en animales y seres humanos.

Osteoclastos. Un osteoclasto es un tipo de célula ósea que elimina el tejido óseo retirando su matriz mineralizada. Se conoce este proceso como resorción del hueso. Los osteoclastos y los osteoblastos son instrumentos para controlar la cantidad de tejido óseo: los osteoblastos forman hueso, los osteoclastos resorben el hueso. Los osteoclastos se forman mediante la fusión de células del linaje celular de monocitos-macrófagos. Los osteoclastos se caracterizan por una elevada expresión de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y la catepsina K.

La formación de osteoclastos requiere la presencia del ligando RANK (activador del receptor del factor nuclear $\kappa\beta$) y MCSF (factor estimulador de colonias de macrófagos). Estas proteínas unidas a membrana se producen por células estromales y osteoblastos adyacentes; requiriendo de esta manera un contacto directo entre estas células y los precursores de osteoclastos. M-CSF actúa a través de su receptor en el osteoclasto, c-fms (receptor del factor 1

estimulador de colonias), un receptor de la tirosina quinasa transmembrana, que conduce a la activación del mensajero secundario de la tirosina quinasa Src. Ambas moléculas son necesarias para la osteoclastogénesis y están ampliamente implicadas en la diferenciación de las células derivadas de monocitos/macrófagos. RANKL es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y es esencial en la osteoclastogénesis. Los ratones RANKL inactivados génicamente presentan un fenotipo de osteoporosis y defectos en la salida de los dientes, junto con una ausencia o deficiencia de osteoclastos. RANKL activa $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (factor nuclear- κB) y NFATc1 (factor nuclear de los linfocitos t activados, citoplásmico, dependiente de calcineurina 1) mediante RANK. La activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ se estimula casi inmediatamente después de producirse la interacción RANKL-RANK, y no está regulada en exceso. La estimulación de NFATc1, sin embargo, comienza 24-48 horas después que se produce la unión y se ha mostrado que su expresión es dependiente de RANKL. La diferenciación de los osteoclastos está inhibida por la osteoprotegerina (OPG), que se une a RANKL evitando la interacción con RANK.

B. Formación del hueso

La formación del hueso durante la etapa fetal del desarrollo se produce mediante dos procesos: osificación intramembranosa y osificación endocondrial. La osificación intramembranosa se produce principalmente durante la formación de los huesos planos del cráneo; el hueso se forma a partir del tejido del mesénquima. Las etapas de la osificación intramembranosa se desarrollan a partir del centro de osificación, calcificación, formación de trabéculas y desarrollo del periostio. La osificación endocondrial, por otra parte, se produce en los huesos largos, tales como en las extremidades; el hueso se forma alrededor de un molde de cartilago. Las etapas en la osificación endocondrial son el desarrollo de un modelo de cartilago, el crecimiento del modelo de cartilago, el desarrollo del centro de osificación primaria y el desarrollo del centro de osificación secundaria.

La osificación endocondrial comienza con puntos en el cartilago denominados "centros de osificación primaria". Aparecen principalmente durante el desarrollo del feto, aunque unos pocos huesos cortos comienzan su osificación primaria después del nacimiento. Son responsables de la formación de la diáfisis de los huesos largos, huesos cortos y determinadas partes de huesos irregulares. La osificación secundaria se produce después del nacimiento, y forma las epífisis de los huesos largos y las extremidades de los huesos irregulares y planos. La diáfisis y ambas epífisis de un hueso largo están separadas por una zona de cartilago en crecimiento (la placa epifisial). Cuando el niño alcanza la madurez del esqueleto (18 a 25 años de edad), todo el cartilago se sustituye por hueso, fusionando la diáfisis y ambas epífisis entre sí (cierre epifisial).

La remodelación o renovación ósea es el proceso de resorción seguido por la sustitución del hueso con poco cambio en la forma y se produce a lo largo de la vida de una persona. Los osteoblastos y osteoclastos, acoplados entre sí mediante la señalización de las células paracrinas, se denominan unidades de remodelación ósea. El objetivo de la remodelación es regular la homeostasia del calcio, reparar los huesos microdañados (debidos al estrés diario) pero también formar y esculpir el esqueleto durante el crecimiento.

El proceso de resorción ósea por los osteoclastos libera el calcio almacenado a la circulación sistémica y es un proceso importante en la regulación del equilibrio del calcio. A medida que la formación del hueso fija activamente el calcio en circulación en su forma mineral, eliminándolo del torrente sanguíneo, la resorción lo desaloja activamente este aumentando de esta forma los niveles de calcio en circulación. Estos procesos se producen en tándem en localizaciones específicas de sitio.

El esfuerzo repetido, tal como el ejercicio que soporta peso o la cicatrización del hueso, da como resultado el engrosamiento del hueso en los puntos de esfuerzo máximo (ley de Wolff). Se ha teorizado que esto es el resultado de las propiedades piezoeléctricas del hueso, que hacen que el hueso genere pequeños potenciales eléctricos bajo tensión.

50 III. Tratamientos

A. Enfermedades y dolencias óseas

Las enfermedades y dolencias que se van a tratar de acuerdo con la invención están especificadas en las reivindicaciones. Otras enfermedades y dolencias referidas a continuación, pero no en las reivindicaciones, se proporcionan como divulgación.

Existe una plétora de dolencias que se caracterizan por la necesidad de potenciar la formación del hueso o de inhibir la resorción del hueso y que de esta manera se beneficiarían del uso de anticuerpos dirigidos contra $\text{TGF-}\beta$ o combinaciones de anticuerpos dirigidos contra $\text{TGF-}\beta$ y agentes secundarios, como se ha descrito anteriormente o células tratadas con los anteriores en la promoción de la formación del hueso y/o la reparación ósea. Quizá lo más evidente sea el caso de las fracturas de huesos, donde sería deseable estimular el crecimiento óseo y acelerar y completar la reparación del hueso. Los agentes que potencian la formación del hueso serían también útiles en los procedimientos de reconstrucción facial. Otras dolencias con déficit de hueso incluyen defectos segmentales óseos, enfermedad periodontal, enfermedad ósea metastásica, enfermedad ósea osteolítica y dolencias donde la reparación del tejido conectivo sería beneficiosa, tal como la cicatrización o regeneración de los defectos o lesiones

del cartílago. También de gran significancia es la dolencia crónica de la osteoporosis, incluyendo la osteoporosis relacionada con la edad y la osteoporosis asociada con estados hormonales posteriores a la menopausia. Otras dolencias caracterizadas por la necesidad de crecimiento del hueso incluyen hiperparatiroidismo primario y secundario, osteoporosis por desuso, osteoporosis relacionada con diabetes, y osteoporosis relacionada con glucocorticoides. Existen algunas otras dolencias, tales como, por ejemplo, deficiencia de vitamina D.

Fracturas. El primer ejemplo es el individuo por otra parte sano que padece una fractura. A menudo, la fractura ósea clínica se trata mediante escayolado para aliviar el dolor y permitir que los mecanismos de reparación naturales reparen la herida. Se han hecho progresos en el tratamiento de las fracturas en los últimos tiempos, sin embargo, incluso sin considerar las diversas complicaciones que puedan surgir en el tratamiento de los huesos fracturados, cualquier nuevo procedimiento para aumentar la cicatrización del hueso en circunstancias normales representaría un gran avance.

Enfermedad periodontal. La enfermedad periodontal progresiva conduce a la pérdida del diente debida a la destrucción de la fijación dental al hueso que la rodea. Aproximadamente 5 - 20 % de la población de EE.UU. (15-60 millones de individuos) padece enfermedad periodontal generalizada grave, y existen 2 millones de procedimientos quirúrgicos relacionados. Además, si la enfermedad se define como la identificación de al menos un sitio de pérdida de la fijación clínica, entonces aproximadamente un 80 % de todos los adultos están afectados, y un 90 % de aquellos que tienen de 55 a 64 años de edad. Si no se trata, aproximadamente un 88 % de los individuos afectados muestran progresión de la enfermedad moderada a rápida que muestra una fuerte correlación con la edad. El tratamiento actual principal de la enfermedad periodontal es la terapia regenerativa consistente en la sustitución de los tejidos periodontales perdidos. La pérdida del hueso se trata usualmente con el propio hueso y la médula ósea del individuo, debido a su alto potencial osteogénico. Se pueden llevar a cabo aloinjertos de hueso (entre individuos) utilizando hueso humano almacenado. Aunque los análisis de costes periodontales actuales son difíciles de obtener, el tamaño de la población afectada y el uso actual de los injertos de hueso como terapia de primer orden sugieren fuertemente que esta área representa una diana atractiva para las terapias de desarrollo de hueso.

Osteopenia/osteoporosis. Los términos osteopenia y osteoporosis se refieren a un grupo homogéneo de trastornos caracterizados por una masa ósea disminuida y fracturas. La osteopenia es una masa ósea que tiene una o más desviaciones estándar por debajo de la masa ósea promedio de una población; la osteoporosis se define como 2,5 SD o inferior. Una población estimada en 20-25 millones de personas está en riesgo creciente de fracturas debido a la pérdida de hueso específica de sitio. Los factores de riesgo para la osteoporosis incluyen el aumento de la edad, el sexo (principalmente mujeres), masa ósea baja, menopausia temprana, raza (caucasianos en general; mujeres asiáticas e hispanas), baja captación de calcio, reducida actividad física, factores genéticos, factores ambientales (incluyendo tabaquismo, alcoholismo o abuso de cafeína), y deficiencias en el control neuromuscular que crean una propensión a las caídas.

Más de un millón de fracturas en los EE.UU. cada año pueden atribuirse a la osteoporosis. En términos económicos, los costes (exclusivamente los salarios perdidos) por los tratamientos contra la osteoporosis son 35.000 millones de dólares en todo el mundo. Las tendencias demográficas (es decir, el aumento gradual de la edad de la población de los EE.UU.) sugiere que estos costes pueden aumentar a 62.000 millones de dólares en el año 2020. Claramente, la osteoporosis es un problema de atención sanitaria significativo.

La osteoporosis, pensada una vez como una parte natural del envejecimiento de la mujer, ya no se considera dependiente de la edad o dependiente del sexo. La osteoporosis se define como un trastorno esquelético caracterizado por una predisposición a un riesgo creciente de fractura debido a una resistencia del hueso alterada. La resistencia ósea refleja la integración de dos características principales: la densidad ósea y la calidad del hueso. La densidad ósea se expresa en gramos de mineral por área o volumen y en cualquier individuo dado se determina por el máximo de masa ósea y la cantidad de pérdida de hueso. La calidad del hueso se refiere a la arquitectura, renovación, la acumulación de daños (por ejemplo, microfracturas) y la mineralización. Una fractura se produce cuando se aplica una fuerza que induce un fallo (por ejemplo, un traumatismo) a un hueso osteoporótico.

Los tratamientos actuales para pacientes con osteoporosis se centran en la prevención de la fractura, no en promover la formación de hueso o la reparación de fracturas. Esto sigue siendo una consideración importante según la bibliografía, que indica claramente que una morbilidad y mortalidad significativas están asociadas al reposo prolongado en cama de las personas mayores, particularmente, en aquellas personas que han sufrido fracturas de cadera. Las complicaciones debidas al reposo en cama incluyen coágulos y neumonía. Estas complicaciones son reconocidas y se toman usualmente medidas para evitarlas, pero estas son apenas el mejor enfoque al tratamiento. Por lo tanto, la población de pacientes osteoporóticos se beneficiaría de nuevos tratamientos diseñados para fortalecer los huesos y acelerar el proceso de reparación de las fracturas, consiguiendo que estas personas se pusieran de pie antes de que surjan complicaciones.

Reconstrucción/injerto de huesos. Un cuarto ejemplo está relacionado con la reconstrucción ósea y, específicamente, la capacidad de reconstruir defectos en el tejido óseo que son resultado de una lesión traumática; como consecuencia del cáncer o de la cirugía contra el cáncer; o como resultado de un defecto congénito; o como resultado del envejecimiento. Existe una necesidad significativa de implantes ortopédicos más frecuentes, y los

- huesos craneales y faciales son dianas concretas para este tipo de necesidades reconstructivas. La disponibilidad de nuevos materiales de implante, por ejemplo, titanio, ha permitido la reparación de defectos relativamente grandes. Los implantes de titanio proporcionan excelente estabilidad temporal a través de los defectos óseos y son un excelente material para implantes óseos o articulaciones artificiales tales como cadera, rodilla y sustitución de articulaciones. Sin embargo, la experiencia ha mostrado que la carencia de hueso viable que se une a los implantes del defecto puede dar como resultado la exposición del aparato a la infección, inestabilidad estructural y, finalmente, al fracaso en la reparación del defecto. Por lo tanto, un agente terapéutico que estimule la formación del hueso o alrededor del implante facilitará una recuperación más rápida.
- Los injertos de huesos autólogos son otra posibilidad, pero tienen algunas desventajas demostradas porque deben extraerse de sitio del donante tal como la cresta ilíaca o una costilla, normalmente ello proporciona una cantidad de hueso insuficiente para rellenar completamente el defecto, y el hueso que se forma es algunas veces propenso a la infección y a la resorción. Las preparaciones xenogénicas parcialmente purificadas no son prácticas para el uso clínico debido a que cantidades en microgramos se purifican a partir de kilogramos de hueso de bovino, haciendo que la producción comercial a gran escala sea costosa e impracticable. Se emplean a menudo por tanto aloinjertos y preparaciones de huesos desmineralizados, pero adolecen de su naturaleza desvitalizada en que solo funcionan como estructuras para el crecimiento endógeno de células óseas.
- Las transferencias microquirúrgicas de injertos de hueso libre con tejido blando y vasos sanguíneos unidos pueden cerrar defectos óseos con una fuente inmediata de suministro de sangre al injerto. Sin embargo, estas técnicas que requieren mucho tiempo, han mostrado producir una gran cantidad de morbilidad, y pueden utilizarse solo por individuos especialmente preparados. Además, el implante óseo está a menudo limitado en su cantidad y no se contornea fácilmente. En la mandíbula, por ejemplo, la mayoría de pacientes no puede usar los aparatos dentales utilizando técnicas aceptadas actualmente (incluso después que se ha establecido la continuidad), y de esta manera consiguen poca mejora en su capacidad de masticación.
- Junto con la reconstrucción del hueso, las áreas de mejora con problemas específicos son las que se refieren al tratamiento de grandes defectos, tales como los creados por traumatismos, defectos congénitos, o de forma concreta, tras la resección de un tumor; y también el área de las articulaciones artificiales. El éxito de los implantes ortopédicos, interfases y articulaciones artificiales podría mejorarse de forma razonable si la superficie del implante, o una parte funcional de un implante, estuviera revestida con un agente estimulador del hueso. La superficie de los implantes podría revestirse con uno o más materiales adecuados a fin de promover una interacción más eficaz con el sitio biológico que rodea el implante y, de manera ideal, promover la reparación del tejido.
- Cáncer de hueso primario y enfermedad ósea metastásica.** El cáncer de hueso se produce de manera infrecuente mientras que la metástasis ósea está presente en una amplia variedad de cánceres, incluyendo cáncer de tiroides, riñón, y pulmón. El cáncer de hueso metastásico es una dolencia crónica; la supervivencia desde el momento del diagnóstico es variable dependiendo del tipo de tumor. En el cáncer de próstata y de mama y en el mieloma múltiple, el tiempo de supervivencia se puede medir en años. Para el cáncer de pulmón avanzado, se mide en meses. Los síntomas de cáncer incluyen dolor, hipercalcemia, fractura patológica, y compresión de la médula o el nervio espinal. El pronóstico del cáncer de hueso metastásico está afectado por el sitio del tumor primario, presencia de una enfermedad extraósea, y la extensión y temporalización de la enfermedad ósea. La progresión del cáncer/metástasis ósea está determinada por los ensayos de diagnóstico por imágenes y la medida de los marcadores específicos óseos. Recientes investigaciones muestran una fuerte correlación entre la tasa de resorción del hueso y el resultado clínico, en términos de progresión de la enfermedad o muerte.
- Mieloma múltiple.** El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia maligna de los linfocitos B caracterizada por la acumulación de células plasmáticas clonales malignas en la médula ósea. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se deben a la sustitución de los componentes de la médula ósea normal por células plasmáticas anómalas, con la consiguiente sobreproducción de una inmunoglobulina monoclonal (proteína M o componente M), destrucción del hueso, dolor de huesos, anemia, hipercalcemia y disfunción renal.
- A diferencia de otros tipos de cánceres que se extienden al hueso (por ejemplo, mama, pulmón, tiroides, riñón, próstata), la enfermedad del mieloma óseo (MBO) no es una enfermedad metastásica. En su lugar, las células de mieloma se derivan de linfocitos B del sistema inmunitario que residen normalmente en la médula ósea y están por tanto íntimamente asociados con el hueso. De hecho, el microentorno de la médula ósea juega un importante papel en el crecimiento, la supervivencia y la resistencia a la quimioterapia de las células de mieloma, que, a su vez, regula la pérdida de hueso aumentada asociada con este trastorno (página web en multiplemyeloma.org). Aproximadamente el 90 % de los pacientes con mieloma tienen implicaciones óseas, comparado con el 40-60 % de los pacientes con cáncer que tienen metástasis ósea, y aproximadamente un 80 % tiene un dolor de huesos intratable. Adicionalmente, aproximadamente un 30 % de los pacientes de mieloma tienen hipercalcemia, que es un resultado de la actividad osteolítica aumentada asociada con esta enfermedad (Cavo *et al.*, 2006).
- Los problemas comunes en el mieloma son la debilidad, la confusión y la fatiga debida a la hipercalcemia. Dolores de cabeza, cambios en la visión y la retinopatía pueden ser el resultado de la hiperviscosidad de la sangre dependiendo de las propiedades de la paraproteína. Finalmente, puede existir dolor radicular, pérdida del control del

intestino o la vejiga (debida a la implicación de la médula espinal que conduce a la compresión de la médula) o síndrome de túnel carpiano y otras neuropatías (debido a la infiltración de los nervios periféricos por el amiloide). Puede proporcionar un aumento de paraplejas en casos que se presentan posteriormente.

- 5 **Enfermedad ósea metastásica.** Tal como se ha descrito anteriormente, a diferencia de la osteolisis asociada con otros tumores óseos, las lesiones de MBD son únicas ya que no sanan ni se reparan, a pesar de que los pacientes tengan muchos años de remisión completa. Mecanicistamente, esto parece estar relacionado con la inhibición y/o la pérdida de los osteoblastos formadores de huesos durante la progresión de la enfermedad. De hecho, los estudios de marcadores óseos y de histomorfometría indican que los osteoclastos resorbedores de hueso y la actividad
- 10 osteoblástica están aumentadas, pero equilibradas al principio de la enfermedad, mientras que la MBD abierta muestra actividad osteoclástica alta y baja actividad osteoblástica. Por lo tanto, la MBD es un trastorno en el que la formación de hueso y la pérdida de hueso están desacopladas y se beneficiarían de tratamientos que estimulen la formación de hueso y el retraso de su pérdida.
- 15 Se han utilizado numerosos enfoques terapéuticos en la MBD, con los criterios de valoración de tratamiento del dolor, hipercalcemia, o la reducción de acontecimientos relacionados con el esqueleto (SRE). Muchos de estos pueden presentar complicaciones graves. La cirugía, tal como la vertebroplastia o la cifoplastia, que se lleva a cabo para el alivio de la estabilidad y el dolor tiene los riesgos quirúrgicos concomitantes (por ejemplo, infección) empeorados por un sistema inmunocomprometido y no invierten los defectos esqueléticos existentes. La
- 20 radioterapia y el tratamiento con isótopos radioactivos se utilizan para prevenir/controlar la progresión de la enfermedad y tienen los riesgos normales de las terapias con irradiación. Más recientemente, fármacos tales como los bisfosfonatos, que inhiben la actividad osteoclástica han llegado a ser un tratamiento estándar para la MBD, a pesar del hecho de trabajan mal en este trastorno. En 9 ensayos doble ciegos, controlados por placebo sobre bisfosfonatos, solo un 66 % de pacientes mostraron una reducción eficaz del dolor; 56 % mostraron una reducción
- 25 en los ser y solo 1 de 9 demostró un beneficio de supervivencia.

B. Tratamientos combinados

- 30 Tal como se describe, la presente invención proporciona el tratamiento de enfermedades óseas y traumatismos óseos mediante la estimulación de la producción de nuevo tejido óseo. Otros agentes se pueden usar junto con los anticuerpos dirigidos contra TGF- β de la presente invención. De forma más general, estos agentes se proporcionarían en una cantidad combinada (junto con los anticuerpos dirigidos contra TGF- β) para producir cualquiera de los efectos anteriormente descritos. Este proceso puede implicar la puesta en contacto de la célula o sujeto con ambos agentes al mismo tiempo. Esto se puede conseguir poniendo en contacto la célula con una única
- 35 composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula o el sujeto con dos composiciones o formulaciones diferentes, al mismo tiempo, en el que una composición incluye el inhibidor intracelular y el resto incluye el segundo agente.

- 40 Como alternativa, un agente puede preceder o seguir al otro en intervalos comprendidos entre minutos y semanas. En realizaciones donde los agentes se aplican independientemente a la célula o sujeto, se debería garantizar de manera general que no transcurra un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de tal forma que siguiera siendo posible que los agentes ejercieran un efecto combinado ventajoso sobre la célula o el sujeto. En tales casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula o el sujeto con ambas modalidades en un plazo de aproximadamente 12-24 h de separación y, más preferentemente, en un plazo de aproximadamente
- 45 6-12 h de separación. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el período de tiempo del tratamiento de forma significativa, sin embargo, donde varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) o varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) pueden transcurrir entre las respectivas administraciones.

- 50 Se pueden emplear varias concentraciones, el anticuerpo dirigido contra TGF- β es "A" y el otro agente es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

- 55 Los protocolos de administración y formulación de dichos agentes seguirán de forma general los habituales para fármacos farmacéuticos, como se analiza más adelante de forma detallada. Los agentes de combinación incluyen bisfosfonatos (Didronel™, Fosamax™ y Actonel™), SERM (Evista) u otros derivados hormonales, y análogos de la hormona paratiroidea (PTH).

60 IV. Formulaciones farmacéuticas y administración

A. Composiciones y vías

- 65 Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos dirigidos contra TGF- β para su uso en la presente invención, disueltos o dispersos en un transportador farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares

que no producen reacciones adversas, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un animal, tales como, por ejemplo, un ser humano, según sea adecuado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo dirigido contra TGF- β , y opcional un principio activo adicional, será conocida de los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a un animal (por ejemplo, un ser humano), se entenderá que las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la FDA Office of Biologics Standards.

Como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retraso de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tintes, materiales de este tipo y combinaciones de los mismos, como sabrá una persona normalmente experta en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990, 1289-1329). Excepto en el caso de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, está contemplado su uso en las composiciones farmacéuticas.

El anticuerpo dirigido contra TGF- β se puede premezclar con diferentes tipos de transportadores dependiendo de si se va administrar por vía oral o mediante inyección. La presente invención se puede administrar por vía bucal, por vía intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intramuscular, por vía intratumoral, en la vasculatura tumoral, por vía subcutánea, mucosal, por vía oral, tópica, local, mediante inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña las células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, nanopartículas, liposomas), o por otros métodos o cualquier combinación de los anteriores, tal como conocería una persona experta en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990). En particular, el anticuerpo dirigido contra TGF- β se formula en una composición que se puede administrar mediante una jeringuilla para usar en una administración intravenosa.

El anticuerpo dirigido contra TGF- β se puede formular en una composición como base libre, neutra o forma salina o éster. También se puede sintetizar/formular como profármaco. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, fumárico, o ácido mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también puede derivarse a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, se administrarán soluciones de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz.

Además, de acuerdo con la presente invención, la composición que comprende el anticuerpo para su uso en la presente invención adecuada para administración se proporciona en un transportador farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El transportador deberá ser asimilable e incluir transportadores líquidos, semisólidos, es decir, pastas, o transportadores sólidos. Salvo en la medida que cualquier medio, agente, diluyente o transportador convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición incluida en la anterior, su uso en una composición administrable que comprende el anticuerpo para su uso en la presente invención es adecuado. Los ejemplos de transportadores o diluyentes adecuados incluyen grasas, aceites, agua, sueros salinos, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, cargas y similares, o sus combinaciones. La composición puede incluir también diferentes antioxidantes que retrasan la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de conservantes tales como varios agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitarse a parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutano, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

En una realización específica de la presente invención, la composición que comprende el anticuerpo para su uso en la presente invención se combina o se mezcla completamente con un transportador semisólido o sólido. La mezcla se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente tal como molienda. Los agentes estabilizantes también se pueden añadir durante el proceso de mezclado para proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, es decir, desnaturalización en el estómago. Los ejemplos de estabilizantes para su uso en la composición incluyen tampones, aminoácidos tales como glicina y lisina, hidratos de carbono tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

En realizaciones adicionales, la presente invención se puede referir al uso de composiciones farmacéuticas con vehículo lipídico que incluyen los anticuerpos dirigidos contra TGF- β de la presente invención, uno o más lípidos, y un disolvente acuoso. Como se usa en el presente documento, el término "lipido" se definirá para incluir cualquiera de una amplia gama de sustancias que sean característicamente insolubles en agua, y se puedan extraer con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es bien conocida de los expertos en la materia, y el término

"lípidos", tal como se usa en el presente documento, no está limitado a ninguna estructura particular. Los ejemplos incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser de origen natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Los lípidos son bien conocidos en la materia, e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos con enlaces éter o éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos.

Una persona experta en la materia estará familiarizada con la gama de técnicas que se pueden utilizar para dispersar una composición en un vehículo lípido. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra TGF- β se pueden dispersar en una solución que contiene un lípido, disolverse en un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, incluirse como suspensión en un lípido, incluirse o complejarse con una micela o liposoma, o asociarse de cualquier otra forma con un lípido o estructura lípida por cualquier medio conocido por los expertos en la materia. La dispersión puede dar como resultado, o no, la formación de liposomas.

La cantidad de dosis real de una composición que comprende el anticuerpo a usar de la presente invención administrada a un paciente animal se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, gravedad de la dolencia, el tipo de enfermedad a tratar, intervenciones terapéuticas anteriores o concurrentes, idiopatía del paciente y vía de administración. Dependiendo de la dosis y de la vía de administración, el número de administraciones de una dosis preferida y/o una cantidad eficaz pueden variar dependiendo de la respuesta del sujeto. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la concentración de ingrediente activo (o ingredientes activos) en una composición y la dosis adecuada para el sujeto individual.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra TGF- β para usar en la presente invención puede estar incluido en composiciones farmacéuticas que comprenden, por ejemplo, al menos aproximadamente un 0,1 % del antagonista, aproximadamente un 0,5 % del antagonista, o aproximadamente un 1,0 % del antagonista. En otras realizaciones, el antagonista puede comprender entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable de los anteriores. Naturalmente, la cantidad de antagonista en cada composición terapéuticamente útil se puede preparar de tal forma que se obtenga una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, la ruta de administración, duración del producto, así como otras consideraciones farmacéuticas se tendrán en cuenta por el experto en la técnica para preparar dichas formulaciones farmacéuticas y, de esta forma, pueden ser deseables varias dosis y regímenes de tratamiento.

En otros ejemplos no limitativos, una dosis de anticuerpo dirigido contra TGF- β también puede comprender de aproximadamente 0,1 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 0,2 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 0,5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de los anteriores. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números listados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, basándose en los números descritos anteriormente.

En realizaciones particulares de la presente invención, los anticuerpos dirigidos contra TGF- β para usar en la presente invención se formulan para su administración mediante una vía alimentaria. Las vías alimentarias incluyen todas las posibles vías de administración en las que la composición se pone en contacto directo con el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se pueden administrar por vía oral, por vía bucal, rectal, o sublingual. De este modo, dichas composiciones se pueden formular en un diluyente inerte o con un transportador comestible asimilable, o se puede incluir en una cápsula de gelatina dura o blanda, o se puede comprimir en comprimidos, o se puede incorporar directamente con los alimentos de la dieta.

En determinadas realizaciones, los principios activos para utilizar en la presente invención pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares (Mathiowitz *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998; patentes de los Estados Unidos con números 5.641.515, 5.580.579 y 5.792.451). Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden incluir lo siguiente: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma tragacanto, acacia, almidón de

maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un aromatizante, tal como, por ejemplo, piperita, aceite de gaulteria, aroma a cereza, aroma a naranja, etc. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede incluir, además de los materiales del tipo citado anteriormente, un transportador líquido. Pueden estar presentes otros materiales como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la dosis unitaria. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden estar recubiertos con shellac, azúcar, o ambos. Cuando la forma farmacéutica es una cápsula, puede incluir, además de los materiales del tipo citado anteriormente, transportadores tales como un transportador líquido. Las cápsulas de gelatina, comprimidos, o pastillas pueden tener un revestimiento entérico. Los revestimientos entéricos evitan la desnaturalización de la composición en el estómago o parte superior del intestino donde el pH es ácido. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.629.001. Tras alcanzar el intestino delgado, su pH básico disuelve el revestimiento y permite que la composición se libere y se absorba por las células especializadas, por ejemplo, enterocitos epiteliales y células M de las placas de Peyer. Un jarabe o elixir puede contener el principio activo, sacarosa como agente edulcorante y metilparabeno y propilparabeno como conservantes, un colorante y un aromatizante, tal como aroma a cereza o a naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma farmacéutica unitaria deberá ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades utilizadas. Además, los principios activos se pueden incorporar a las preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Para administración oral, tal como en el tratamiento de la enfermedad periodontal, las composiciones que comprenden el anticuerpo para usar en la presente invención puede incorporarse alternativamente con uno o más excipientes en la forma de un colutorio, dentífrico, comprimido bucal, pulverización oral, gel, o formulación administrada por vía sublingual. Por ejemplo, puede prepararse un enjuague bucal incorporando el principio activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado, tal como una solución de borato de sodio (Solución Dobell). Como alternativa, el principio activo puede incorporarse a una solución oral tal como una que contenga borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o dispersarse en un dentífrico, o añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes, y humectantes. Alternativamente, las composiciones se pueden conformar en un comprimido, gel o forma de solución que puede ponerse bajo la lengua, a lo largo de la encía, cepillarse sobre las superficies dentales, o disolverse en la boca de cualquier otra forma. Las patentes de Estados Unidos 6.074.674 y 6.270.750 describen composiciones tópicas de liberación sostenida para procedimiento periodontales.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos dirigidos contra TGF- β pueden administrarse mediante una ruta parenteral. Como se usa en el presente documento, el término "parenteral" incluye rutas que evitan el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se pueden administrar, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea, o intraperitoneal. Patentes de Estados Unidos 6.537.514, 6.613.308, 5.466.468, 5.543.158; 5.641.515; y 5.399.363. Las soluciones de los principios activos en forma de base libre o como sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones incluyen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación en otro momento de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de Estados Unidos 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que debe poder inyectarse con facilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (es decir, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez correcta se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por medio de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, también puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso de composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monostearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. En esta línea, se pueden emplear medios acuosos estériles conocidos de los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosis puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermoclitosis o se inyecta en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas

1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la dolencia del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir la esterilidad, la pirogenicidad, la seguridad y los estándares de pureza generales que se requieren por la
 5 FDA Office of Biologics Standards.

Las formulaciones de liberación sostenida para tratar las enfermedades óseas incluyen las patentes de Estados Unidos 4.722.948, 4.843.112, 4.975.526, 5.085.861, 5.162.114, 5.741.796 y 6.936.270. Los métodos y las composiciones inyectables para la reparación de huesos se describen en las patentes de Estados Unidos 4.863.732,
 10 5.531.791, 5.840.290, 6.281.195, 6.288.043, 6.485.754, 6.662.805 y 7.008.433.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con otros diversos ingredientes indicados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado a vacío y las técnicas de criodesecación que dan como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una de sus soluciones anteriormente filtrada en estéril. Una composición en polvo se combina con un portador líquido tal como, por
 15 ejemplo, agua o una solución salina, con o sin un agente estabilizante.
 20

B. Dispositivos (no reivindicado)

Además de proporcionar anticuerpos dirigidos contra TGF-β para su administración mediante las rutas anteriormente citadas, dichos agentes, solos o en combinación, se pueden utilizar en el contexto de dispositivos, tales como
 25 implantes. Se contempla varios implantes relacionados con el hueso, incluidos los implantes dentales, implantes en articulaciones tales como caderas, rodillas, y codos, implantes vertebrales/dorsales, y otros. Los anticuerpos dirigidos contra TGF-β se pueden impregnar sobre una superficie del implante, incluidos una matriz o recubrimiento bioactivo. El inhibidor se puede formular adicionalmente para una liberación sostenida, retrasada, prolongada o
 30 temporalizada. El recubrimiento puede comprender polímeros, por ejemplo, tales como los relacionados a continuación. Se indica a continuación una lista de patentes de Estados Unidos relacionadas con implantes y dispositivos óseos que se pueden utilizar de acuerdo con esta realización de la invención:

TABLA 1 • PATENTES DE IMPLANTES ÓSEOS

Patente de Estados Unidos	Título de la patente
7.044.972	Bone implant, in particular, an inter-vertebral implant
7.022.137	Bone hemi-lumbar interbody spinal fusion implant having an asymmetrical leading end and method of installation thereof
7.001.551	Method of forming a composite bone material implant
6.994.726	Dual function prosthetic bone implant and method for preparing the same
6.989.031	Hemi-interbody spinal implant manufactured from a major long bone ring or a bone composite
6.988.015	Bone implant
6.981.975	Method for inserting a spinal fusion implant having deployable bone engaging projections
6.981.872	Bone implant method of implanting, and kit for use in making implants, particularly useful with respect to dental implants
6.929.662	End member for a bone fusion implant
6.923.830	Spinal fusion implant having deployable bone engaging projections
6.921.264	Implant to be implanted in bone tissue or in bone tissue supplemented with bone substitute material
6.918.766	Method, arrangement and use of an implant for ensuring delivery of bioactive substance to the bone and/or tissue surrounding the implant
6.913.621	Flexible implant using partially demineralized bone
6.899.734	Modular implant for fusing adjacent bone structure
6.860.884	Implant for bone connector
6.852.129	Adjustable bone fusion implant and method
6.802.845	Implant for bone connector
6.786.908	Bone fracture support implant with non-metal spacers
6.767.367	Spinal fusion implant having deployable bone engaging projections
6.761.738	Reinforced molded implant formed of cortical bone
6.755.832	Bone plate implant
6.730.129	Implant for application in bone, method for producing such an implant, and use of such an implant
6.689.167	Method of using spinal fusion device, bone joining implant, and vertebral fusion implant

ES 2 598 006 T3

6.689.136	Implant for fixing two bone fragments to each other
6.666.890	Bone hemi-lumbar interbody spinal implant having an asymmetrical leading end and method of installation thereof
6.652.592	Segmentally demineralized bone implant
6.648.917	Adjustable bone fusion implant and method
6.607.557	Artificial bone graft implant
6.599.322	Method for producing undercut micro recesses in a surface, a surgical implant made thereby, and method for fixing an implant to bone
6.562.074	Adjustable bone fusion implant and method
6.562.073	Spinal bone implant
D473,944	Bone implant
6.540.770	Reversible fixation device for securing an implant in bone
6.537.277	Implant for fixing a bone plate
6.506.051	Bone implant with intermediate member and expanding assembly
6.478.825	Implant, method of making same and use of the implant for the treatment of bone defects
6.458.136	Orthopaedic instrument for sizing implant sites and for pressurizing bone cement and a method for using the same
6.447.545	Self-aligning bone implant
6.436.146	Implant for treating ailments of a joint or a bone
6.371.986	Spinal fusion device, bone joining implant, and vertebral fusion implant
6.370.418	Device and method for measuring the position of a bone implant
6.364.880	Spinal implant with bone screws
6.350.283	Bone hemi-lumbar interbody spinal implant having an asymmetrical leading end and method of installation thereof
6.350.126	Bone implant
6.287.343	Threaded spinal implant with bone ingrowth openings
6.270.346	Dental implant for bone regrowth
6.248.109	Implant for interconnecting two bone fragments
6.217.617	Bone implant and method of securing
6.214.050	Expandable implant for inter-bone stabilization and adapted to extrude osteogenic material, and a method of stabilizing bones while extruding osteogenic material
6.213.775	Method of fastening an implant to a bone and an implant therefor
6.206.923	Flexible implant using partially demineralized bone
6.203.545	Implant for fixing bone fragments after an osteotomy
6.149.689	Implant as bone replacement
6.149.688	Artificial bone graft implant
6.149.686	Threaded spinal implant with bone ingrowth openings
6.126.662	Bone implant
6.083.264	Implant material for replacing or augmenting living bone tissue involving thermoplastic syntactic foam
6.058.590	Apparatus and methods for embedding a biocompatible material in a polymer bone implant
6.018.094	Implant and insert assembly for bone and uses thereof
5.976.147	Modular instrumentation for bone preparation and implant trial reduction of orthopedic implants
5.906.488	Releasable holding device preventing undesirable rotation during tightening of a screw connection in a bone anchored implant
5.899.939	Bone-derived implant for load-supporting applications
5.895.425	Bone implant
5.890.902	Implant bone locking mechanism and artificial periodontal ligament system
5.885.287	Self-tapping interbody bone implant
5.819.748	Implant for use in bone surgery
5.810.589	Dental implant abutment combination that reduces crestal bone stress
5.759.035	Bone fusion dental implant with hybrid anchor
5.720.750	Device for the preparation of a tubular bone for the insertion of an implant shaft
5.709.683	Interbody bone implant having conjoining stabilization features for bony fusion
5.709.547	Dental implant for anchorage in cortical bone
5.674.725	Implant materials having a phosphatase and an organophosphorus compound for in vivo mineralization of bone
5.658.338	Prosthetic modular bone fixation mantle and implant system
D381,080	Combined metallic skull base surgical implant and bone flap fixation plate
5.639.402	Method for fabricating artificial bone implant green parts
5.624.462	Bone implant and method of securing
D378,314	Bone spinal implant
5.607.430	Bone stabilization implant having a bone plate portion with integral cable clamping means
5.571.185	Process for the production of a bone implant and a bone implant produced thereby
5.456.723	Metallic implant anchorable to bone tissue for replacing a broken or diseased bone

5.441.538	Bone implant and method of securing
5.405.388	Bone biopsy implant
5.397.358	Bone implant
5.383.935	Prosthetic implant with self-generated current for early fixation in skeletal bone
5.364.268	Method for installing a dental implant fixture in cortical bone
5.312.256	Dental implant for vertical penetration, adapted to different degrees of hardness of the bone

V. Ensayos de cribado (no reivindicado)

5 También se divulgan en el presente documento métodos para identificar anticuerpos nuevos y útiles contra el TGF- β para su uso en la estimulación de la producción de hueso. Por ejemplo, un método comprende por lo general:

(a) proporcionar un anticuerpo candidato;

10 (b) premezclar el modulador candidato con una célula o animal experimental adecuado;

(c) medir la actividad de osteoblastos u osteoclastos, o el crecimiento, resistencia, masa o formación del hueso; y

(d) comparar la característica medida en la etapa (c) con la observada en ausencia del candidato,

15 en el que una diferencia entre la característica medida indica que dicho candidato es, de hecho, un estimulante de la producción de hueso.

Los ensayos se pueden realizar en células aisladas o en organismos incluyendo animales transgénicos. La formación de hueso se puede identificar mediante la tinción de von Kossa o con rojo alizarina, análisis espectrométrico mediante FTIR o Raman, o mediante fluorocromos unidos a compuestos que se unen al hueso.

20 Se entenderá, por supuesto, que todos los métodos de cribado de la divulgación son útiles por sí mismos entendiéndose el hecho que es posible que no se descubran candidatos eficaces. La divulgación proporciona métodos para cribar dichos candidatos, no solamente métodos para encontrarlos.

25 VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para demostrar realizaciones preferidas de la presente invención.

30 Ejemplo 1 -Materiales y métodos

Anticuerpos. El anticuerpo 1D11 lo generó Genzyme Corporation (Framingham). El anticuerpo del control (13C4) consistente en un complejo IgG idéntico carece de cualquiera de las capacidades de unión a TGF- β .

35 **Régimen de tratamiento.** Ratones C57B1/6 machos normales de 13 semanas de edad (Harlan) (n = 5) se trataron con 10 mg/kg/x3 semanas de 1D11 o anticuerpo del control. Cada reactivo se administró mediante inyección intraperitoneal estéril durante un periodo de tiempo de 4 semanas (FIG. 1). Se llevaron a cabo todos los procedimientos con animales de acuerdo con los protocolos de la IACUC homologados por el Vanderbilt University Medical Center.

40 **Obtención de imágenes.** Se analizaron la tibia y el fémur mediante digitalización con μ CT (μ CT40, Scanco) a un tamaño de vóxel isotrópico de 12 μ m (55 Kv). Después de identificar cada placa de crecimiento en cada conjunto de digitalizaciones, se digitalizó la región metafiseal de 200 μ m por debajo de esta área y se analizó para determinar las alteraciones en los parámetros del hueso trabecular (Umbral 280).

45 **Histología e histomorfometría.** Se recogieron cuerpos vertebrales lumbares (L3-5) y huesos largos tras el sacrificio y se fijaron durante hasta 48 h en formol al 10 %. Se procesaron las regiones descalcificadas de las vértebras y se incluyeron en resina de tipo metilmetacrilato y se seccionaron a 5 μ m. Las secciones se desplastificaron y se tiñeron para determinar los iones de calcio unidos utilizando el procedimiento de Von Kossa con una contratinción de van Gieson, o utilizando una técnica de tinción posterior al acoplamiento para la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Se descalcificaron los huesos largos durante 2 semanas en EDTA al 10 % y se procesaron en cera de parafina. Las muestras se seccionaron a 5 μ m y se tiñeron con H&E/Orange G, o para la actividad de TRAP. El volumen óseo y la distribución celular se cuantificaron histomorfométricamente utilizando el programa informático de cuantificación Osteomeasure (Osteometrics).

55 **Expresión génica** Se evaluó la relación de expresión del gen RANKL/OPG en osteoblastos T23 tratados con 1D11 o con el control, con ARN aislado utilizando los kits de extracción RNEasy (Qiagen). Se adquirieron cebadores Taqman validados y se analizaron las muestras utilizando un sistema PCR en tiempo real 7300 (Applied Biosystems) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Se evaluó la expresión osteogénica utilizando las técnicas de la RT-PCR normalizadas.

60 **Expresión de proteínas.** Se aisló suero normal de ratones tratados y no tratados mediante exsanguinación antes

del sacrificio. Se evaluó el suero mediante enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) para determinar los niveles de RANKL o de la proteína OPG utilizando el sistema Quantikine Immunoassay (R&D Systems) con el concentrado y una dilución en suero x 5 utilizado para RANKL y OPG, respectivamente.

5 **Ensayo de resorción en orina.** Se recogieron muestras de orina de todos los animales antes del sacrificio. Se cuantificó la desoxipiridinolina del producto de degradación del colágeno (DPD) mediante ELISA utilizando el ensayo MicroVue-DPD (Quidel Corp.) según las directrices del fabricante y se normalizó para los niveles de creatinina urinaria (MicroVue-Creatinine, Quidel Corp.).

10 **Ensayo bioquímico.** La resistencia y el módulo de la región diafisal del fémur se analizaron bioquímicamente. Fémures frescos se situaron horizontalmente sobre rodillos de soporte y se cargaron monotónicamente en una flexión de tres puntos a una velocidad de 3 mm/min, utilizando un sistema de ensayo de materiales (Dynamight 8841; Instron). Se registró la curva de fuerza-desplazamiento para proporcionar la fuerza máxima soportada por el hueso y la rigidez inicial. Utilizando el momento de inercia derivado de uCT y las ecuaciones flexurales de la teoría de haces (Schriefer *et al.*, 2005), los inventores convirtieron estas propiedades estructurales en la resistencia a flexión y el módulo del hueso completo.

15 **Microespectroscopía Raman.** La composición química del tejido óseo se caracterizó mediante microespectroscopía Raman confocal (Renishaw). Se incluyeron las tibias en PMMA y se cortaron en la metáfisis por debajo del lugar de crecimiento para exponer una sección transversal de la corteza. Esta superficie se molió sucesivamente sobre esmeriles en papel de carburo de silicio y se pulió con 1 μm de suspensión de alúmina. Un objetivo de 50x enfoca el láser (una fuente de un diodo láser de 785 nm) en una región de 3 μm por debajo de la superficie del tejido, se recogió una luz inelástica mediante un espectrógrafo Renishaw (1 cm^{-1} de resolución espectral). El espectro medido consistió en tres acumulaciones con un tiempo de integración de 10 s cada una.

25 Utilizando comandos Matlab personalizados, se sustrajo la fluorescencia de fondo en el espectro mediante un algoritmo de ajuste polinómico modificado (Lieber *et al.*, 2003). Se recogieron los espectros de 10 localizaciones trabeculares con la metáfisis tibial (molida por debajo de la placa de crecimiento). Se calculó la relación entre el mineral y el colágeno como la intensidad del pico de fosfato v1 (962 cm^{-1}) por la intensidad del pico de prolina (856 cm^{-1}) y se promedió por hueso.

30 **Nanoindentación.** Se cuantificó el módulo a nivel tisular mediante nanoindentación. Se sondaron las regiones incluidas en resina de la diáfisis tibial utilizando un Nanoindenter XP (MTS XP). Una punta de diamante Berkovitch (ángulo de inclinación: 142,30; radio: 100 nm) se presionó contra la superficie utilizando un esquema de carga trapezoidal de la siguiente forma: 1) carga a una velocidad de deformación de 0,5/s a una profundidad de 1 μm , 2) mantener a Pmax durante 10 segundos, 3) descargar a 350 $\mu\text{N s}^{-1}$ a 90 % de Pmax, y 4) dejar el indentador sobre la superficie durante 60 segundos a fin de establecer la deriva térmica. A partir de la curva fuerza-desplazamiento resultante, se calculó el módulo elástico (E) del tejido en el punto de indentación (0,25 μm de resolución) siguiendo los métodos de Oliver y Pharr (2004). Esto implica un procedimiento de calibración inicial utilizando sílice fundida para establecer la relación entre la profundidad de la indentación y el área de contacto de la punta, y para determinar la pendiente de la parte sin cargar de la curva fuerza-desplazamiento. Se recogieron diez indentaciones por hueso, donde los datos se representan en forma de promedio \pm SE.

40 **Análisis estadístico.** Se determinaron los valores estadísticamente significativos mediante el test de la t de Students y Mann-Whitney y los valores p menores de 0,05 se consideraron significativos.

45 EJEMPLO 2 • RESULTADOS

La inhibición de TGF- β mediante el tratamiento con anticuerpo 1D11, reseñado en la FIG. 1, aumentó significativamente el volumen óseo largo en comparación con los controles (FIGS. 2A-B). El hueso trabecular en la metáfisis de la tibia analizada mediante digitalización con μCT mostró un drástico aumento en BV/TV global (FIG. 2C), densidad mineral ósea (BMD) (FIG. 2D), espesor trabecular (FIG. 2E) y separación trabecular disminuida (FIG. 2F) en animales tratados con 1D11 en comparación con ratones tratados con el control. El análisis histomorfométrico de secciones descalcificadas de las vértebras lumbares respaldó el análisis μCT de los huesos largos. La inhibición de TGF- β mediada por 1D11 conduce a un aumento del 54 % en el BV/TV trabecular. Este aumento en el hueso estuvo acompañado por un mayor número de trabéculas, disminución de la separación trabecular y aumento del engrosamiento trabecular (FIGS. 3A-B).

Un análisis de la distribución de células óseas en las secciones vertebrales teñidas con TRAP mostró números de osteoclastos y un área superficial significativamente reducidos tras el tratamiento con 1D11 (FIGS. 4A-C). Por el contrario, se observó un número de osteoblastos y un área de osteoblastos revistiendo la superficie ósea elevados en ratones tratados con 1D11, en comparación con los controles (FIG. 4D). Además de alteraciones en el número de células óseas, la masa ósea global y la integridad esquelética pueden verse también afectadas por los cambios en la tasa de remodelación del hueso. Para determinar las tasas de renovación tras el tratamiento con 1D11, los inventores evaluaron la desoxipiridinolina en el producto de degradación del colágeno (DPD) en muestras de orina recogidas en el sacrificio. En respaldo de los datos histomorfométricos, la relación DPD/creatinina indicó una disminución en la actividad resorptiva tras el tratamiento con 1D11 (control = $39,3 \pm 5,6$; 1D11 = $12,0 \pm 6,2 \mu\text{g}$ de

proteína).

En los años recientes ha quedado claro que, además de la cantidad global de hueso presente en el esqueleto, la calidad del hueso es también un elemento esencial a considerar cuando se analizan nuevas terapias y sus efectos sobre el esqueleto. Para resolver esto, los inventores llevaron a cabo una flexión de 3 puntos sobre los fémures extirpados para determinar el efecto del tratamiento con 1D11 sobre las propiedades biomecánicas del hueso. El bloqueo de la señalización de TGF- β dio como resultado huesos considerablemente más fuertes con una resistencia a la flexión y un módulo del hueso completo aumentados (FIG. 5). Se determinó también el efecto de 1D11 sobre el módulo esquelético a un nivel tisular utilizando nanoindentación. Estos hallazgos respaldan los datos biomecánicos que muestran un módulo de nivel tisular potenciado tras el tratamiento con 1D11 (Tabla 2). Además, La microespectroscopía Raman permitió a los inventores analizar y cuantificar el efecto del bloqueo de TGF- β sobre los componentes composicionales del hueso. Estos estudios demostraron un aumento del 11 % en la relación entre mineral y colágeno del hueso trabecular en la metáfisis tibial tras el tratamiento con 1D11. Sin embargo, la calidad de la hidroxiapatita y la cristalinidad global del componente inorgánico permaneció inalterada (Tabla 2).

La integridad esquelética se mantuvo cuando las actividades de formación de osteoblastos y osteoclastos estaban equilibradas. Un mecanismo primario que media la resorción del hueso osteoclástico se produce mediante la expresión de RANKL/OPG en los osteoclastos. Como TGF- β había mostrado previamente alterar la relación RANKL/OPG (Mohammad *et al.*, 2009; Karst *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2001; Thirunavukkarasu *et al.*, 2001), los inventores examinaron el efecto del tratamiento con 1D11 sobre la expresión génica de RANKL/OPG en líneas de osteoblastos *in vitro* y evaluaron los niveles de proteína RANKL y OPG *in vivo*, en muestras de suero procedentes de animales tratados con 1D11 o con el control. En cultivo, el tratamiento con TGF- β disminuyó la expresión del ARNm de RANKL (*ranks/gapdh*; $1,6 \pm 0,2$ versus $0,7 \pm 0,1$) y aumentó la expresión del gen OPG (*opg/gapdh*: $1,7 \pm 0,1$ versus $2,4 \pm 0,2$). Este efecto se bloqueó mediante la adición de 1D11 a cultivos de osteoblastos. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en individuos con niveles de proteínas RANKL (control = $31,9 \pm 7,6$; 1D11 = $17,0 \pm 1,8$ pg/ml) u OPG (control = $487,7 \pm 22,6$; 1D11 = $451,5 \pm 20,4$ pg/ml) que fueron detectables en muestras de suero procedentes de ratones tratados o no tratados, aunque los niveles de RANKL reducidos conducen a una disminución del 50 % en la relación de RANKL/OPG global. Además, el efecto directo de TGF- β sobre la expresión del gen osteógeno se analizó *in vitro*. El tratamiento de los osteoblastos 2T3 con TGF- β indujo una disminución del 49,3 % en la expresión del gen de la fosfatasa alcalina y un aumento del 331,8 % en la expresión de PTHrP, como se determinó mediante la PCR. Este aumento se evitó completamente mediante el tratamiento con 1D11 además de TGF- β . No se observaron alteraciones en los niveles de expresión del análisis x2, β -catenina, colágeno de tipo 1 u osteocalcina, con idénticos resultados observados en la línea de células osteoblásticas MC3T3. Juntos, estas investigaciones confirman un efecto beneficioso global en el esqueleto tras la neutralización de TGF- β en el entorno de la médula ósea.

Tabla 2 • Parámetros de composición del hueso tratado

	Control	1011
<i>Nanoindentación</i>		
Módulo nivel tejido (GPa)	$22,7 \pm 0,5$	$24,3 \pm 1,3^*$
<i>Microespectroscopía Raman</i>		
Relación de colágeno mineral (%)	$5,5 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1^*$
Sustituciones de carbonato	$0,185 \pm 0,012$	$0,169 \pm 0,009$
Cristalinidad	$0,078 \pm 0,005$	$0,081 \pm 0,002$

EJEMPLO 3. DISCUSIÓN

Este estudio investiga el uso de un anticuerpo neutralizante de TGF- β como un agente óseo anabólico y resalta el potencial de inhibición de TGF- β como mecanismo para aumentar la masa ósea. Los inventores emplearon técnicas normalizadas aceptadas junto con tecnologías emergentes para analizar en profundidad el volumen, la densidad, la resistencia y la composición del hueso. Juntos, estos estudios demuestran que los fármacos destinados a bloquear la ruta de señalización de TGF- β tienen la capacidad de regular positivamente el número de osteoblastos a la vez que disminuyen simultáneamente la cantidad de osteoclastos activos en la médula ósea. Esto dio como resultado un importante aumento en el volumen y la calidad del hueso, similar al observado en los estudios de roedores tratados con PTH (Dempster *et al.*, 1993).

Existe una considerable necesidad de agentes anabólicos óseos más eficaces. Actualmente, el enfoque terapéutico principal para la excesiva pérdida de hueso es el uso de antirresortivos tales como bisfosfonatos. Aunque estos agentes son ciertamente capaces de reprimir la resorción del hueso adicional, son incapaces de estimular nuevos ciclos de formación para sustituir el hueso que se ha perdido. Los inventores han mostrado que el direccionamiento de TGF- β con un anticuerpo neutralizante tiene la capacidad de evitar la destrucción de hueso mediante la

disminución de los osteoclastos, a la vez que incrementa simultáneamente los osteoblastos. El resultado directo es una mejora neta en la masa ósea en las regiones esqueléticas apendicular y axial. También se ha demostrado que los huesos largos son considerablemente más fuertes con las propiedades composicionales de la matriz potenciadas de forma favorable para un funcionamiento normal del esqueleto.

5 Una pérdida de hueso elevada, tal como la observada en la osteoporosis, conduce con frecuencia a un aumento en el riesgo de fracturas. Esta característica es el resultado en última instancia de una pérdida global de resistencia y una calidad del hueso disminuida en el esqueleto. Se ha sugerido que este déficit en la calidad del hueso no se puede tener en cuenta solo por la disminución en el volumen óseo, sugiriendo un defecto intrínseco en la producción
10 de nueva matriz ósea en estos individuos. El hueso normal comprende usualmente una relación equilibrada de matriz de colágeno orgánico y componente mineral inorgánico. Aunque una desregulación excesiva de cada elemento da como resultado profundos defectos esqueléticos, la relación puede modificarse a lo largo de la vida para aumentar la resistencia global del hueso y la resistencia a la fractura. El tratamiento con 1D11 aumentó la relación entre mineral y colágeno del hueso trabecular sin deteriorar la pureza del hidroxiapatito, como se evalúa por
15 el nivel de sustituciones del carbonato dentro del cristal, sugiriendo que la inhibición de TGF- β en este entorno favorece la producción de hueso de calidad mejorada. Asimismo, las características composicionales potenciadas del hueso tratado con 1D11 se traducen bien en un aumento global en la resistencia del hueso en estos animales. Estos datos se vieron apoyados por modelos de ratones modificados genéticamente cuando la señalización de TGF- β perturbada aumenta la resistencia del hueso (Balooch *et al.*, 2005), aunque no se sabe si este sistema
20 representaría un enfoque terapéutico viable y eficaz para aumentar la masa ósea. Los drásticos efectos beneficiosos notificados en el estudio de los inventores proporcionan una fuerte evidencia para el desarrollo de agentes farmacéuticos específicamente dirigidos a la inhibición de TGF- β para aumentar la masa y la resistencia ósea.

Dosis intermitentes de hormona paratiroidea (PTH) representan actualmente el único enfoque clínicamente
25 disponible para aumentar el volumen óseo. Sin embargo, el mecanismo a través del cual PTH induce este efecto no está todavía claro. Además, el tratamiento continuo con PTH ha demostrado estimular la resorción del hueso osteoclástico y disminuir la masa ósea global (Raisz, 2005). Al igual que PTH, la neutralización del TGF- β mediante el tratamiento con anticuerpo 1D11 mejoró ampliamente los parámetros esqueléticos, y al igual que PTH, el mecanismo verdadero a través del cual se puede producir sigue siendo desconocido. Pero a diferencia de los
30 efectos de PTH, 1D11 regula negativamente los osteoclastos, inhibiendo la degradación del hueso y ofreciendo un doble enfoque para potenciar la masa ósea mediante un aumento en el número de osteoblastos y una disminución en la resorción osteoclástica.

A pesar de una amplia bibliografía que describe los efectos de TGF- β sobre los osteocitos, sigue estando poco claro
35 cómo la inhibición de TGF- β media en los acontecimientos esqueléticos *in vivo*. Recientes estudios sugieren una desregulación de las moléculas osteoclastogénicas primarias (RANKL/OPG) o en la remodelación del hueso mediada por efrina (Mohammad *et al.*, 2009).

Los inventores examinaron los niveles de proteínas RANKL y OPG solubles en sueros de ratones tras el tratamiento
40 con 1D11 o control y señalaron una tendencia hacia una disminución en la relación RANKL/OPG conseguida por los niveles de RANKL disminuidos. Este hallazgo puede estar asociado con la expresión disminuida de PTHrP observada en osteoblastos tratados con 1D11, ya que se sabe que PTHrP estimula RANKL en este tipo de células (Lee y Lorenzo, 1999; Itoh *et al.*, 2000). Aunque estas observaciones *in vivo* son consistentes con los estudios
45 actuales (Mohammad *et al.*, 2009) y sugieren que el tratamiento con 1D11 podría aumentar el volumen óseo suprimiendo la regulación de TGF- β de RANKL u OPG en los osteoblastos, el contraste con estudios moleculares *in vitro* indica que el tratamiento con TGF- β conduce a una reducción significativa en RANKL y aumenta la expresión del ARNm de OPG, que se podría bloquear por 1D11. Estos hallazgos son consistentes con los estudios publicados que documentan la regulación de TGF- β de RANKL/OPG *in vitro* (Quinn *et al.*, 2001; Thirunavukkarasu *et al.*, 2001)
50 y sugieren con fuerza un papel diverso de TGF- β en la fisiología normal, que no está bien recapitulada en los sistemas de cultivo, y es probablemente dependiente de las interacciones con otras moléculas reguladoras. Es por tanto necesaria una interpretación cuidadosa de los resultados cuando se analizan las diferencias entre la función de TGF- β *in vitro* e *in vivo*.

Los osteoblastos se derivan de una población de citoblastos del mesénquima en la médula ósea. Se estimularon las
55 células precursoras para alcanzar el linaje osteoblástico mediante factores estimuladores tales como BMP-2 (Katagiri *et al.*, 1990; Takuwa *et al.*, 1991). El análisis molecular de la expresión osteogénica del gen, que sugiere que la actividad osteoblástica puede estar alterada por el tratamiento con 1D11 *in vitro*, evidenció niveles aumentados de fosfatasa alcalina. Este hallazgo está correlacionado con los datos publicados (Filvaroff *et al.*, 1999; Alliston *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2005), aunque fracasan en ilustrar cualquier efecto principal sobre la maduración de
60 precursores para aumentar el número de osteoblastos, como se demostró por los hallazgos de los inventores *in vivo*. Esto sugiere que la inhibición local de TGF- β en la médula ósea puede afectar la formación del hueso durante este periodo de tratamiento, pero el mecanismo verdadero que gobierna cualquier cambio en la osteoblastogénesis sigue siendo desconocido.

65

Además de los efectos directos sobre las células óseas, los inventores son incapaces de excluir un efecto sistémico de TGF- β en este sistema. Es plausible que el control de TGF- β de los procesos fisiológicos normales afecte negativamente la masa ósea, y el bloqueo de estos efectos es beneficioso en último extremo para la salud del esqueleto. Es también posible que el control de TGF- β de la formación o la actividad de los osteocitos varíe temporalmente a medida que cambia la población celular de la médula. Esto sería consistente con los estudios *in vitro* que describen efectos diferenciales sobre células precursoras en comparación a la matriz madura que forma los osteoblastos (Mundy and Bonewald, 1990). Los inventores utilizaron ratones macho C57Bl/6 maduros para resaltar los efectos beneficiosos del bloqueo de TGF- β sobre el esqueleto. Serán necesarios estudios adicionales utilizando modelos de pérdida de hueso para evaluar si el tratamiento con 1D11 aumenta el hueso en estas condiciones. A pesar de esto, el uso por parte de los inventores de ratones C57Bl/6, (de los que se notificó que tienen la menor BMD de todas las razas de ratón disponibles Beamer *et al.*, 1996), sugiere que es probable que la inhibición de TGF- β mejore las propiedades esqueléticas en el caso de masa ósea baja, también en modelos de envejecimiento u osteopénicos.

En apoyo de estos datos, las moléculas pequeñas destinadas al bloqueo de la señalización de TGF- β inhibiendo la actividad quinasa del receptor de TGF- β que se ha demostrado recientemente que aumenta la masa ósea (Mohammad *et al.*, 2009). Aunque estas moléculas demuestran una potenciación significativa en el hueso trabecular, el bloqueo de TGF- β mediado por 1D11 aumenta el volumen de hueso trabecular y mejora la resistencia ósea cortical. Estos efectos esqueléticos superiores pueden ser un resultado de la completa eliminación de la señalización de TGF- β a través de la avidéz de la unión y la neutralización de todas las isoformas de TGF- β extracelulares, en comparación con la inhibición de las enzimas asociadas al receptor intracelular dirigidas actualmente por moléculas pequeñas. Estos hallazgos ilustran claramente el potencial de los compuestos que se pueden dirigirse específicamente TGF- β *in vivo*, y sugieren un enfoque terapéutico para aumentar la masa ósea en condiciones donde es prevalente la destrucción excesiva de hueso, tal como la osteoporosis.

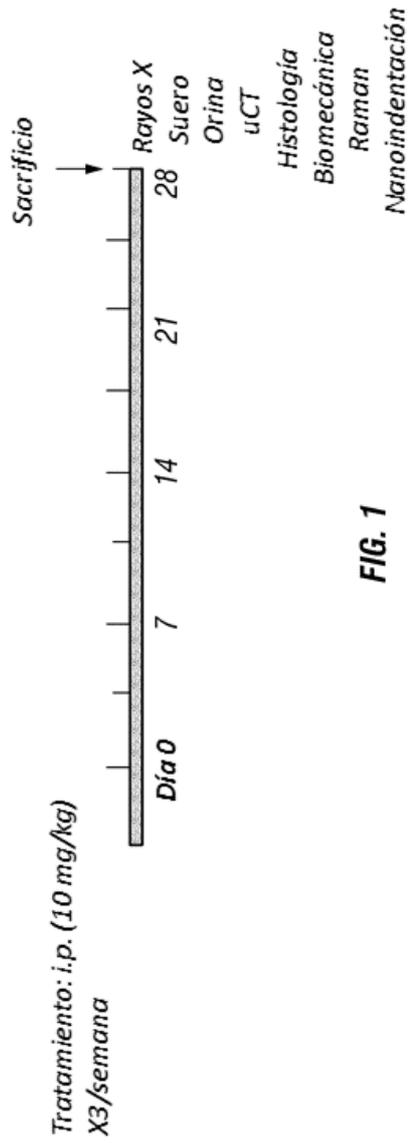
VII. Referencias

- Patente de Estados Unidos 4.196.265.
 Patente de Estados Unidos 4.722.948.
 Patente de Estados Unidos 4.843.112.
 Patente de Estados Unidos 4.863.732.
 Patente de Estados Unidos 4.975.526.
 Patente de Estados Unidos 5.571.714.
 Patente de Estados Unidos 5.772.998.
 Patente de Estados Unidos 5.783.185.
 Patente de Estados Unidos 5.085.861.
 Patente de Estados Unidos 5.162.114.
 Patente de Estados Unidos 5.399.363.
 Patente de Estados Unidos 5.466.468.
 Patente de Estados Unidos 5.531.791.
 Patente de Estados Unidos 5.543.158.
 Patente de Estados Unidos 5.580.579.
 Patente de Estados Unidos 5.629.001.
 Patente de Estados Unidos 5.641.515.
 Patente de Estados Unidos 5.741.796.
 Patente de Estados Unidos 5.792.451.
 Patente de Estados Unidos 5.840.290.
 Patente de Estados Unidos 5.972.703.
 Patente de Estados Unidos 6.074.674.
 Patente de Estados Unidos 6.270.750.
 Patente de Estados Unidos 6.281.195.
 Patente de Estados Unidos 6.288.043.
 Patente de Estados Unidos 6.485.754.
 Patente de Estados Unidos 6.537.514.
 Patente de Estados Unidos 6.613.308.
 Patente de Estados Unidos 6.662.805.
 Patente de Estados Unidos 6.936.270.
 Patente de Estados Unidos 7.008.433.
 Alliston et al., EMJO. J., 20(9):2254-2272, 2001.
 Ashton et al., Bone, 6:313-319,1985.
 Aubin, Biochem. Cell Biology, 76:899-910,1998.
 Balooch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(52):18813-18818, 2005.
 Beamer et al., Bone, 18(5):397-403, 1996.
 Beidler et al., J. Immunol., 141(11):4053-4060, 1988.
 Bleiberg, Connect Tissue Res., 14:121-127,1985.
 Campbell et al., Am. Rev. Respir. Dis., 130(3):417-423, 1984.

- Cavo et al., *New England Journal of Medicine* 354:1076-1078, 2006.
 Dempster et al., *Endocr. Rev.*, 14(6):690-709, 1993.
 EP Application 125,023
 EP Application 171,496
 5 EP Application 173,494
 EP Application 184,187 Filvaroff et al., *Development*, 126(19):4267-4279, 1999.
 Friedenstein et al., *Exp. Hematol.*, 10:217-227, 1982.
 Friedenstein et al., *Transplantation*, 6:230-247, 1968.
 Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
 10 Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Academic Press, Orlando, FL, pp 60-61, 71-74, 1986.
 Gronthos et al., *Blood*, 84:4164-4173, 1994.
 Gronthos et al., *J. Bone Min. Res.*, 14:47-56, 1999.
 Harlow and Lane, In: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
 15 Hwang et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 15(3):243-284, 1998.
 Itoh et al., *J. Bone Miner res.*, 15(9): 1766-1775, 2000.
 Jaiswal et al., *J. Biol. Chem.*, 275:9645-9652, 2000.
 Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986.
 Kadiyala et al., *Cell Transplantation*, 6:125-134, 1997.
 20 Kale et al., *Nat. Biotech.*, 18:954-958, 2000.
 Kang et al., *EMBO. J.*, 24(14):2543-2555, 2005.
 Karst et al., *J. Cell Physiol.*, 200:99-106, 2004.
 Katagiri et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172(1):295-299, 1990.
 Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
 25 Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
 Lee and Lorenzo, *Endocrinology*, 140(8):3552-3561, 1999.
 Lieber et al., *Appl. Spectrosc.* 57:1363-67, 2003.
 Long, *J. Clin. Invest.*, 95:881-887, 1995.
 Mathiowitz et al., *Nature*, 386(6623):410-414, 1997.
 30 Mohammad et al., *PLoS ONE*, 4:e5275, 2009.
 Morrison, *Science*, 229(4719):1202-1207, 1985.
 Mundy and Bonewald, *Ann. NY Acad. Sci.*, 593:91-97, 1990.
 Oliver & Pharr, *J. Mater. Res.*, 19:3-20, 2004.
 PCT Appln. PCT/uS86/02269 PCT Appln. WO 86/01533 Petite et al., *Nat. Biotech.*, 18:959-963, 2000.
 35 Phinney et al., *J. Cellular Biochem.*, 75:424-436, 1999.
 Pittenger et al., *Science*, 284:143-147, 1999.
 Quinn et al., *J. Bone Miner. Res.*, 16:1787-94, 2001.
 Raisz, *J. Clin. Invest.*, 115(12):3318-3325, 2005.
 Reddi and Huggins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:1601-1605, 1972.
 40 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. Mack Printing Company, pp. 1289-1329, 1990.
 Schriefer et al., *J. Biomech.*, 38:467-75, 2006.
 Shaw et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80(19):1553-1559, 1988.
 45 Sun et al., *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.
 Takuwa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174(1):96-101, 1991.
 Terpos et al., *Annals of Oncology* 16:1223-1231, 2005.
 Thirunavukkarasu et al., *J. Biol Chem.*, 276:36241-50, 2001.
 Verhoeyen et al., *Science*, 239(4847):1534-1536, 1988.
 50 Wood et al., *J. Clin. Lab. Immunol.*, 17(4):167-171, 1985.
 Zohar et al., *Blood*, 90:3471-3481, 1997.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo que se une inmunológicamente a TGF- β para su uso en un método para aumentar la masa ósea y/o el volumen óseo y/o aumentar el crecimiento del hueso y/o la resistencia del hueso en un sujeto, en donde dicho sujeto padece osteoporosis, fractura ósea, pérdida de hueso debida a traumatismo o enfermedad de Paget, en donde el sujeto no tiene cáncer y en donde el anticuerpo se une a las tres isoformas de TGF- β .
- 10 2. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el método para aumentar la masa ósea comprende al menos administrar dicho anticuerpo dos veces.
3. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 2, en donde el método comprende administrar dicho anticuerpo tres veces a la semana.
- 15 4. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 2, en donde el método comprende administrar dicho anticuerpo al menos 9 veces.
5. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde los métodos para aumentar la masa ósea y el crecimiento óseo comprenden administrar sistémicamente dicho anticuerpo a dicho sujeto.
- 20 6. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 5, en donde los métodos comprenden administrar dicho anticuerpo por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica.
7. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde los métodos para aumentar la masa ósea y el crecimiento óseo comprenden administrar dicho anticuerpo a un sitio óseo diana.
- 25 8. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 7, en donde el método para aumentar la masa ósea comprende inyectar dicho anticuerpo en dicho sitio o mediante un dispositivo de liberación temporalizada en dicho sitio.
- 30 9. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un ser humano o un animal no humano.
10. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 9, en donde el método es un método para aumentar la masa ósea y dicho animal no humano es un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono o una vaca.
- 35 11. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el método comprende además evaluar la masa ósea después de la administración de dicho anticuerpo.
12. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 11, en donde la evaluación de la masa ósea comprende obtener imágenes del hueso.
- 40 13. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es para usar en un método para aumentar la resistencia del hueso.
14. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es para usar en un método para aumentar el volumen óseo.
- 45 15. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es para usar en un método para aumentar la masa ósea.



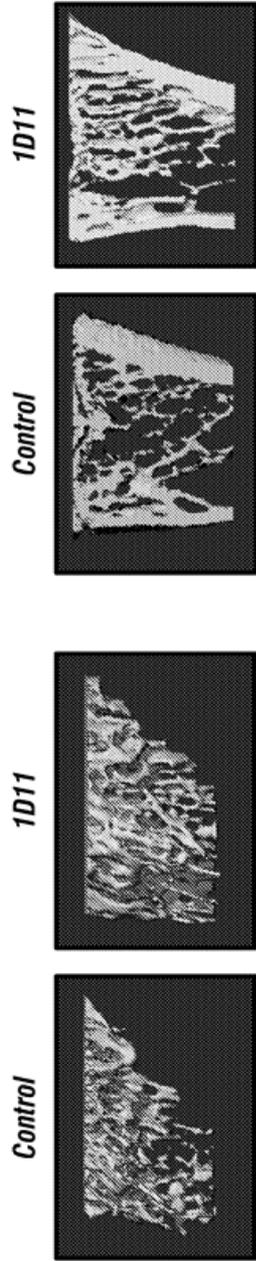


FIG. 2A

FIG. 2B

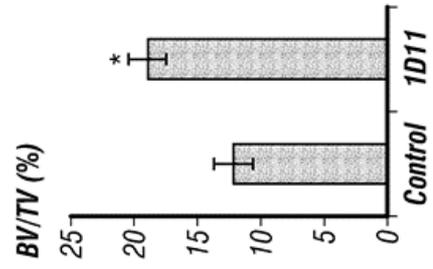


FIG. 2C

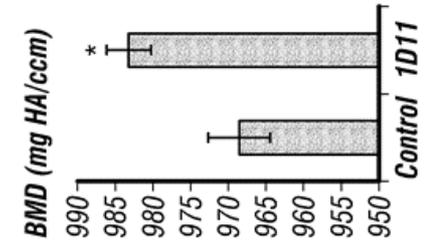


FIG. 2D

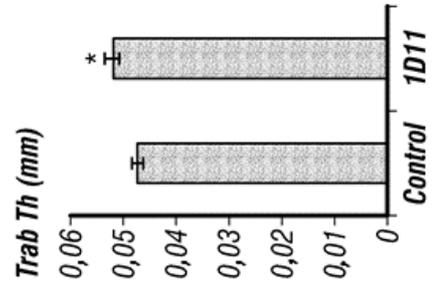


FIG. 2E

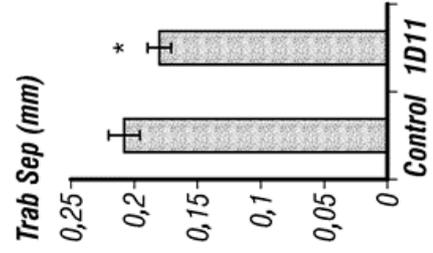


FIG. 2F

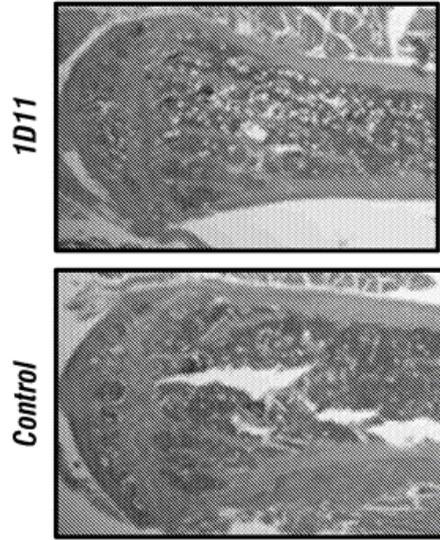


FIG. 3B

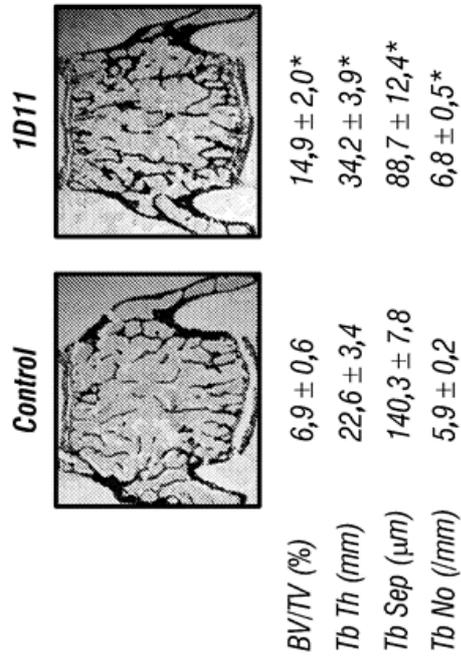


FIG. 3A

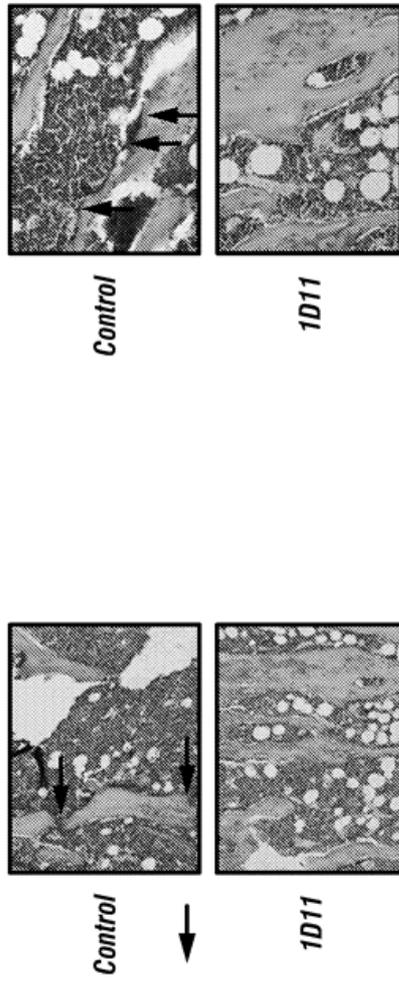


FIG. 4B

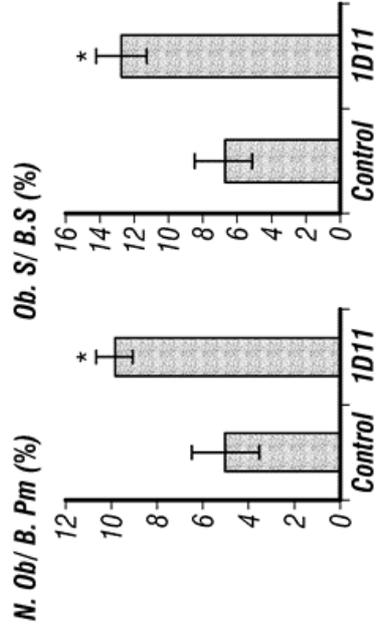


FIG. 4D

FIG. 4A

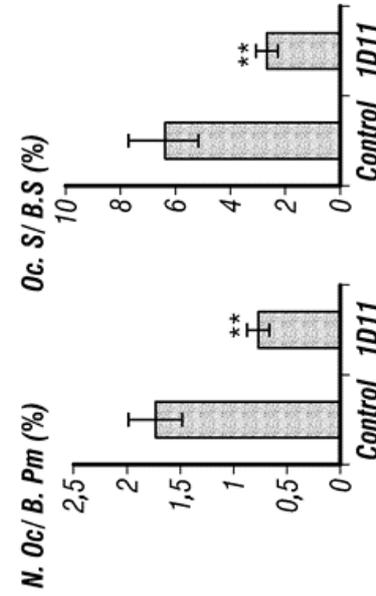


FIG. 4C

