

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 727**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2010 PCT/US2010/033057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10127180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010 E 10770383 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2424892**

54 Título: **Anticuerpos contra DC-STAMP**

30 Prioridad:

30.04.2009 US 174219 P

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

04.10.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF ROCHESTER (100.0%)
601 Elmwood Avenue Box OTT
Rochester, NY 14642, US**

72 Inventor/es:

**SCHWARZ, EDWARD M.;
MENSAH, KOFI A.;
CHIU, YAHUI GRACE y
RITCHLIN, CHRISTOPHER T.**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 635 727 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 contra DC-STAMP

5 ANTECEDENTES

El hueso es un órgano muy dinámico como se demuestra por el proceso de remodelación ósea que se basa en un equilibrio delicado entre la formación ósea y la resorción ósea y se orquesta por los osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC). La interacción coordinada de OB y OC remodela continuamente el hueso a través de acontecimientos moleculares y celulares altamente regulados de tal manera que el esqueleto humano entero se reemplaza en el transcurso de cada década de vida. La alteración del equilibrio homeostático de eliminación y reemplazo de hueso puede manifestarse como una pérdida patológica de hueso que se observa en la osteoporosis, enfermedad periodontal y en algunas artritis inflamatorias, o como una formación inapropiada de hueso nuevo (por ejemplo, espondiloartritis).

15 SUMARIO

En el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales como se definen en las reivindicaciones, que se unen específicamente a un epítipo de la proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP). Específicamente, el anticuerpo se une a un epítipo de DC-STAMP que comprende la secuencia de aminoácidos Glu-Val-His-Leu-Lys-Leu-His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln (SEQ ID NO:1).

También se proporcionan composiciones que comprenden el anticuerpo como se define en las reivindicaciones.

También se proporcionan métodos para inhibir la osteoclastogénesis en una célula (por ejemplo, un osteoclasto o célula precursora de osteoclastos). Los métodos comprenden administrar a la célula una composición que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de DC-STAMP.

También se proporcionan secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera del anticuerpo que se unen específicamente a DC-STAMP. También se detallan vectores que incluyen las secuencias de ácido nucleico que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y/o ligera, o partes de las mismas (por ejemplo, regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo que se une específicamente a DC-STAMP y las células hospedadoras transformadas con el vector o vectores que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y/o ligera o partes de las mismas.

35 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra que el mAb 1A2 reconoce DC-STAMP e indica sus niveles de proteína en OC maduros. La Figura 1A muestra la inmunoprecipitación-inmunotransferencia de un lisado celular de células RAW 264.7 CD11b+ tratadas con RANKL durante 2 días para generar OCP. Después de la inmunoprecipitación con el mAb 1A2, se realizó inmunotransferencia con el mAb 1A2, el anticuerpo policlonal de conejo KR104 (control positivo) o un anticuerpo anti-IgG de ratón (control negativo) en condiciones no reductoras (nr: β -mercaptoetanol) o reductoras (r: + β -mercaptoetanol). M: marcador de proteína, superposición explorada blanca y negra. La transferencia representa 4 ensayos separados. La Figura 1B muestra lisados celulares de macrófagos de médula ósea murina cultivados con M-CSF y RANKL durante 2 días (para generar OCP – precursores de osteoclastos) o 4 días para generar (OCL – osteoclastos) que se sometieron a inmunotransferencia con el mAb 1A2 anti-DC-STAMP, catepsina K (marcador de OCL maduro) y β -actina (control de carga). Los números mostrados debajo de las bandas representan valores de densitometría usados como una medida semicuantitativa del nivel relativo de proteína. La transferencia representa 2 ensayos separados.

La Figura 2 muestra células positivas para DC-STAMP en la superficie que expresan marcadores de linaje mieloide.

La Figura 2A muestra citometría de flujo sobre PBMC recogidas de ratones WT C57B1/6 de 20 semanas de edad ($n = 3$) que muestran la tinción para DC-STAMP-FITC entre células CD11b+ (sólido, panel derecho) y células CD11b- (contorno, panel izquierdo). El histograma es representativo de >3 experimentos. La Figura 2B muestra la citometría de flujo en células de médula ósea reunidas CD11b+DC-STAMP+ seleccionadas electrónicamente procedentes de ratones WT C57B1/6 de 20 semanas de edad ($n = 3$) que muestran tinción multicolor para marcadores mieloides (CD11c y Gr1) y marcadores de linfocitos T (CD4 y CD8a). Los números representan el porcentaje de células en las regiones indicadas. La Figura 3 muestra la dinámica temporal de la expresión del gen de DC-STAMP durante condiciones de diferenciación de OC y mDC. La Figura 3A (panel izquierdo) muestra una tinción TRAP representativa de células multinucleadas generadas a partir de un cultivo RANKL de macrófagos de médula ósea. La Figura 3A (panel derecho) muestra una imagen fluorescente representativa de células derivadas de médula ósea cultivadas con IL-4 + GM-CSF y teñidas con faloidina para destacar la actina en los procesos dendríticos. La Figura 3B muestra histogramas de citometría de flujo realizados en células derivadas de médula ósea teñidas con anticuerpos marcados con fluorescencia específicos para CD11b y CD11c que se cultivaron durante 3 días con M-CSF para enriquecer la población CD11b+ adherente. Después, las

células se cultivaron adicionalmente con RANKL o IL-4 + GM-CSF durante 1, 2 o 3 días. Se muestran gráficos de puntos representativos de >3 experimentos.

La Figura 4 muestra que la citometría de flujo de superficie e intracelular revela patrones de expresión diferenciales para la proteína DC-STAMP en el desarrollo de OC y mDC, así como heterogeneidad en OCP durante la osteoclastogénesis. La Figura 4A muestra un histograma de citometría de flujo de superficie representativo que muestra la tinción con DC-STAMP-FITC de células de médula ósea adherentes CD11b+ enriquecidas con M-CSF cultivadas con RANKL durante 1, 2 o 3 días. La línea discontinua indica el nivel el día 1, mientras que los histogramas sombreados en gris representan el valor durante el día indicado. Los números indican el porcentaje de células en la región indicada. La Figura 4B muestra un histograma de citometría de flujo de superficie representativo que muestra la tinción con DC-STAMP-FITC de células de médula ósea adherentes CD 11b+ enriquecidas con GM-CSF cultivadas con IL-4 + GM-CSF durante 1, 2 o 3 días. La línea de puntos indica el nivel el día 1 mientras que los histogramas sombreados en gris representan el valor para el día indicado. Los números indican el porcentaje de células en la región indicada. La Figura 4C muestra un histograma de citometría de flujo intracelular representativo que muestra la tinción DC-STAMP-FITC de células de médula ósea adherentes CD11b+ enriquecidas con M-CSF cultivadas con RANKL durante 1, 2 o 3 días. Los números indican el porcentaje de células que expresan DC-STAMP intracelular. La Figura 4D muestra un histograma de citometría de flujo intracelular representativo que muestra la tinción con DC-STAMP-FITC de células de médula ósea adherentes CD11b+ enriquecidas con M-CSF cultivadas con IL-4 + GM-CSF durante 1, 2 o 3 días. Los números indican el porcentaje de células que expresan DC-STAMP intracelular.

La Figura 5 muestra que la citometría de flujo de superficie y la inmunofluorescencia intracelular revelan patrones de expresión diferenciales para la proteína DC-STAMP en el desarrollo de OC y mDC humanos, de forma similar a lo observado en células murinas. Las Figura 5A y 5B muestran un histograma de citometría de flujo de superficie representativo que muestra la tinción DC-STAMP-FITC de monocitos CD14+ humanos enriquecidos procedentes de sangre periférica de un individuo sano cultivados con RANKL y M-CSF (A) o IL-4 + GM-CSF (B) durante 1 o 2 días. El histograma sólido indica el nivel el día 0, mientras que los histogramas de contorno representan el valor para el día indicado. La Figura 5C muestra una imagen inmunofluorescente representativa que demuestra un monocito CD14+ humano enriquecido cultivado con RANKL y M-CSF y que presenta la morfología alargada descrita previamente como característica de los OCP ya que responden a estímulos de RANK durante la osteoclastogénesis. La Figura 5D muestra una imagen inmunofluorescente representativa que demuestra un monocito humano CD14+ enriquecido cultivado con IL-4 + GM-CSF y que presenta procesos dendríticos.

La Figura 6 muestra la fenotipificación de las células de superficie DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL. La Figura 6A muestra un histograma de citometría de flujo intracelular representativo que muestra la tinción DC-STAMP-FITC de células RAW 264.7 de superficie DC-STAMP^{lo} (histograma blanco) y DC-STAMP^{hi} (histograma sombreado) inducidas con RANKL. La Figura 6B muestra un histograma de citometría de flujo representativo de células RAW 264.7 cultivadas con RANKL durante 3 días y seleccionadas electrónicamente como de superficie DC-STAMP^{hi} (R1) y de superficie DC-STAMP^{lo} (R2) y después analizadas por dispersión frontal y dispersión lateral (gráfico de puntos). La Figura 6C muestra gráficos de puntos representativos de células DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL y células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL que se clasificaron y se volvieron a cultivar con IL-4 y GM-CSF durante 3 días. Después de este periodo de tiempo, las células se tificaron para determinar la expresión de MHCII y CD11c usando anticuerpos marcados con fluorescencia específicos.

La Figura 7 muestra PBMC Gr1^{lo} que contienen tanto poblaciones de DC-STAMP^{lo} como poblaciones de DC-STAMP^{hi}, mientras que las PBMC Gr1^{hi} contienen una población de DC-STAMP^{hi}. La Figura 7A muestra un gráfico de puntos de citometría de flujo representativo para dispersión frontal y dispersión lateral de PBMC reunidas procedentes de ratones C57B1/6 de 12 semanas de edad (n= 3). Se muestra la región que indica los monocitos (R1). El número indica la proporción de PBMC en esta región. La Figura 7B (panel izquierdo) muestra una citometría de flujo representativa de PBMC teñidas para Gr1 y CD11c. La región R2 representa células Gr1+CD11c. La Figura 7B (panel derecho) muestra gráficos de puntos de citometría de flujo representativos de la región R2 seleccionada electrónicamente de forma adicional en regiones Gr1^{lo} (R3) y Gr1^{hi} (R4). Los números indican el porcentaje relativo de células en cada región. La Figura 7C muestra histogramas de citometría de flujo representativos de PBMC del portal citométrico de monocitos R1, el portal citométrico R3 de Gr1^{lo}CD11c- o el portal citométrico R4 de Gr1^{hi}CD11c- para indicar la presencia o ausencia de PBMC DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} en las poblaciones seleccionadas. Los números representan el porcentaje de células DC-STAMP^{lo}.

La Figura 8 muestra que las células DC-STAMP^{lo} inducidas con RANKL representan un subtipo más osteoclastogénico de OCP y son necesarias para la formación de grandes células multinucleadas TRAP+. La Figura 8A muestra células RAW 264.7 DC-STAMP^{hi} y DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL que se clasificaron basándose en la expresión de DC-STAMP en la superficie como se indica y se volvieron a cultivar con RANKL durante 3 días más como poblaciones homogéneas (DC-STAMP^{lo} o DC-STAMP^{hi}) o poblaciones mixtas a relaciones de 10:1, 1:1 o 1:10 DC-STAMP^{lo}:DC-STAMP^{hi}. Se muestran fotografías representativas de los cultivos teñidos con TRAP para demostrar el potencial osteoclastogénico relativo de las diferentes condiciones de cultivo. Los números indican el área media de células multinucleadas TRAP+ y se presenta en mm². La Figura 8B (panel izquierdo) muestra un gráfico de barras que demuestra el cambio en veces en el ARNm de DC-STAMP relativo en las células RAW 264.7 DC-STAMP^{hi} (barra blanca) y DC-STAMP^{lo} (barra negra) inducidas por RANKL. La Figura 8B (panel derecho) muestra un gráfico de barras que demuestra el cambio de veces en el ARNm de DC-STAMP relativo en células DC-STAMP^{hi} (barra blanca) y DC-STAMP^{lo} (barra negra) inducidas por RANKL. Los

gráficos son representativos de experimentos realizados por triplicado y los datos están normalizados para la β -actina. *P < 0,05 frente a niveles de expresión génica de DC-STAMP^{lo}. La Figura 8C muestra un gráfico de barras que demuestra el cambio en veces relativo del ARNm frente a genes marcadores de OC o genes relacionados con la fusión en células RAW 264.7 DC-STAMP^{hi} (barras blancas) y DC-STAMP^{lo} (barras negras) inducidas por RANKL. Los gráficos son representativos de experimentos realizados por triplicado y los datos están normalizados para la β -actina. *P < 0,05 frente a niveles de expresión génica de DC-STAMP^{lo}.

La Figura 9 muestra que existe una subserie de células que expresan DC-STAMP en la superficie entre monocitos humanos CD14+ que portan proteínas de superficie relacionadas con la fusión. La Figura 9A muestra un histograma de citometría de flujo representativo de PBMC aisladas recientemente de un individuo sano usando anticuerpos específicos marcados con fluorescencia contra CD14, DC-STAMP y proteínas relacionadas con la fusión (CD9, CD44, CD47 y SIRPa). La Figura 9B muestra una tabla que demuestra el cambio en veces relativo del ARNm para genes marcadores de OC o genes relacionados con la fusión en células DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos están normalizados para la β -actina.

La Figura 10 muestra un mayor porcentaje de DC-STAMP en la superficie con expresión de CD11b+ en artritis inflamatoria erosiva. Las Figuras 10A y 10B (paneles de la izquierda) muestran imágenes 3D-CT reconstruidas representativas de la articulación de la rodilla derecha de ratones CD57B1/6 de 20 semanas de edad (A) o ratones TNF-Tg de 20 semanas de edad (B) y los gráficos de puntos de citometría de flujo asociados (paneles de la derecha) de PBMC reunidas procedentes de los ratones (n = 3-5) teñidas con anticuerpos específicos marcados con fluorescencia contra CD11b y DC-STAMP. Los números representan el porcentaje de células en el cuadrante indicado. Las Figuras 10C y 10D muestran gráficos de puntos de citometría de flujo representativos de PBMC de un individuo sano (HC) (Figura 10C) o un individuo con RA (Figura 10D) con tinción con anticuerpos específicos marcados con fluorescencia contra CD14 y DC-STAMP. Los números representan porcentajes de células en los cuadrantes indicados. La Figura 10E muestra histogramas de citometría de flujo representativos de PBMC en las regiones recuadradas en C y D para mostrar diferencias en el nivel de DC-STAMP en la superficie.

La Figura 11 muestra que IFN- α impide el desarrollo inducido por RANKL de una célula DC-STAMP^{lo} y mantiene el fenotipo DC-STAMP^{hi}. La Figura 11A muestra un histograma de citometría de flujo representativo de células RAW 264.7 que se cultivaron durante 1, 2, 3 o 4 días con IFN- α y se tiñeron con anticuerpo marcado con fluorescencia contra DC-STAMP para citometría de flujo. Los histogramas de citometría de flujo representativos de >3 experimentos muestran el patrón de expresión en superficie de DC-STAMP para cada día (histograma gris sólido) y para las células no tratadas (histograma de puntos). La Figura 11B muestra un histograma de citometría de flujo representativo como se describe en (A) en células RAW 264.7 cultivadas durante 3 días con RANKL, IFN- α , RANKL antes que IFN- α , o IFN- α antes que RANKL. Los histogramas representativos muestran el patrón de expresión en superficie de DC-STAMP para cada condición de cultivo para revelar el efecto dependiente del estadio de la exposición a IFN- α . La Figura 11C muestra un histograma de citometría de flujo intracelular representativo realizado usando un anticuerpo marcado con fluorescencia contra DC-STAMP en células tratadas con RANKL o IFN- α durante 3 días. La Figura 11D muestra una citometría de flujo representativa para DC-STAMP de superficie en células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL clasificadas y que se volvieron a cultivar durante 3 días con RANKL, RANKL e IFN- α , o IFN- α solo. La Figura 11E muestra una citometría de flujo representativa para DC-STAMP de superficie en macrófagos de médula ósea de ratones WT C57B1/6 o IFNR1-/- cultivados con RANKL durante 4 días. Los números indican el porcentaje de células en la región DC-STAMP^{lo} indicada.

La Figura 12 muestra que los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL expresan más IFN de tipo I que los OCP DC-STAMP^{hi} y son capaces de generar células multinucleadas TRAP+ en co-cultivo con células expuestas a IFN- α . La Figura 12A muestra gráficos de barras que demuestran el cambio en veces relativo de ARNm (\pm SEM) para IFN de tipo I y SOCS1 y SOCS3 que contrarrestan los efectos de los IFN de tipo I en OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANK clasificados con FACS (barras negras) y OCP DC-STAMP^{hi} (barras blancas). Los gráficos son representativos de experimentos realizados por triplicado y los datos están normalizados para la β -actina. *P<0,05 frente a DC-STAMP^{lo}. La Figura 12B muestra histogramas de citometría de flujo representativos que demuestran pSTAT1 intracelular en OCP DC-STAMP^{hi} y DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL procedentes de macrófagos de médula ósea de C57B1/6 después de 4 días de cultivo con RANKL (histogramas grises sólidos) en comparación con macrófagos de médula ósea antes de la exposición a RANKL (histograma de contorno negro). Los números representan el porcentaje de células en las regiones indicadas. La Figura 12C muestra un gráfico de barras que demuestra células DC-STAMP^{hi} y DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL clasificadas por FACS o células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL clasificadas con FACS y células RAW 264.7 cultivadas con IFN- α durante 3 días que se co-cultivaron durante 3 días más con RANKL. El número medio de células multinucleadas TRAP+ por pocillo \pm SEM (n = 4) se cuantificó para el co-cultivo de DC-STAMP^{lo} + DC-STAMP^{hi} inducido por RANKL (barra blanca) o DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL + células cultivadas con IFN- α (barra rayada).

La Figura 13 muestra que ratones NZBxNZW F1 con artrosis no erosiva y ratones NZW tratados con Ad-IFN- α con SIA tienen una menor frecuencia de PBMC CD11b+DC-STAMP^{lo} y una población de PBMC CD11b+DC-STAMP^{hi} prominente. Las Figuras 13A-13C muestran gráficos de puntos de citometría de flujo representativos de sangre que se recogió a partir de los ratones NZW y NZBxNZW F1 (A, B) de 2, 5 y 9 meses de edad, y de los ratones NZW tratados con Ad-IFN- α y SIA (C). Se marcaron PBMC con anticuerpos marcados con fluorescencia

específicos para CD11b y DC-STAMP, y se analizaron por citometría de flujo como se describe en la sección de Métodos. Se muestran gráficos de puntos representativos para destacar el porcentaje de PBMC CD11b+DC-STAMP^{lo} en las regiones recuadradas indicadas.

La Figura 14 muestra que un transcriptoma de IFN- α elevado se correlaciona significativamente con una menor frecuencia de PBMC CD11b+DC-STAMP^{lo}. Una menor frecuencia de PBMC CD11b+DC-STAMP^{lo} se correlaciona significativamente con un mayor volumen óseo. La Figura 14A muestra un gráfico que demuestra un análisis de regresión lineal del porcentaje de PBMC CD11b+DC-STAMP^{lo} y datos de expresión del gen *IFI202*. La Figura 14B muestra un gráfico que demuestra un análisis de regresión lineal del porcentaje de PBMC CD11b+DC-STAMP^{lo} y el volumen del astrágalo. Los puntos individuales representan valores medios para 3-5 ratones.

La Figura 15 muestra una caracterización funcional del mAb 1A2 contra DC-STAMP. La Figura 15A es un gráfico que demuestra que existe una correlación positiva entre la expresión de DC-STAMP y CD16. Los monocitos CD14+CD16+ humanos tienen una mayor expresión en superficie de DC-STAMP que las células CD14+CD16-. Se purificaron PBMC humanos por gradiente de Ficoll y se tiñeron con un cóctel de anticuerpo compuesto de anticuerpos 7-AAD, DC-STAMP y CD16. La expresión de DC-STAMP en células CD14+CD16- y CD14+CD16 se marcó en gris y negro respectivamente. Para este análisis se usó el anticuerpo policlonal de DC-STAMP disponible en el mercado KR104. La Figura 15B es una imagen de una transferencia de Western que muestra proteínas de dos controles sanos (HC A y HC B) que se aislaron, se inmunoprecipitaron, se separaron por gel de proteína en gradiente al 10 % y se sondaron con el mAb 1A2 contra DC-STAMP. La Figura 15C muestra imágenes de expresión de DC-STAMP en PBMC humanas y células gigantes (tumor óseo) detectadas por tinción inmunohistoquímica (IHC) usando 1A2, (a) y (b). Se purificaron PBMC humanas por gradiente de Ficoll, se incluyeron en parafina para obtener secciones y se tiñeron con (a) control de isotipo de IgG2a de ratón o (b) 1A2. Se seccionaron muestras de biopsia humana recogidas de tumores óseos, y se tiñeron con (c) control de isotipo de IgG2a de ratón o (d) 1A2. Tanto el 1A2 como el control de isotipo de IgG2a de ratón se diluyeron a 1:1500 para la tinción. La expresión polarizada de DC-STAMP en células de tumor óseo se etiquetó mediante flechas. La Figura 15D muestra que el mAb 1A2 contra DC-STAMP podía bloquear la formación de OC *in vitro*. Se cultivaron monocitos humanos enriquecidos en ausencia (a) o presencia (b) de 1A2 durante 8 días y se tiñeron con TRAP para la visualización y enumeración de OC. La Figura 15D(c) muestra un gráfico del recuento medio de OC en ausencia (barra izquierda, 489 ± 284) o presencia (barra derecha, 60 ± 107) de 1A2 en el cultivo celular. Se empleó el ensayo de permutación con 10^5 re-muestrajes para el análisis estadístico. El ensayo de permutación mostró una diferencia significativa entre dos condiciones de cultivo ($p=0,013$). Los datos mostrados fueron para 6 sujetos analizados y presentados en la Tabla 2.

La Figura 16 muestra que DC-STAMP se expresa en la superficie de monocitos y una pequeña subserie de células CD3+ en PBMC humanas. La Figura 16A muestra un análisis de expresión de DC-STAMP en PBMC humanas. Se purificaron PBMC humanas a partir de sangre entera por gradiente de Ficoll, se sometieron a tinción con anticuerpo y análisis de citometría de flujo. Las PBMC humanas se tiñeron con un cóctel de anticuerpo compuesto de 6 anticuerpos. Primero se excluyeron las células muertas (7AAD+) del análisis de los presentes solicitantes (a); y las PBMC vivas se seleccionaron basándose en el tamaño celular por FSC y en la granularidad celular por SSC en 3 subseries (b) (P1, P2 y P3). La expresión de CD14 y DC-STAMP en la subserie P1, P2 y P3 se mostró en (c), (d) y (e), respectivamente. La expresión en la superficie de DC-STAMP en las células seleccionadas P1, P2 y P3 (f). Los datos mostrados son representativos de 4 sujetos HC y 4 PsA. La Figura 16B muestra que DC-STAMP se expresa en una subserie pequeña de células CD3+. Se purificaron PBMC humanas y se tiñeron con un cóctel de anticuerpo compuesto de 6 anticuerpos. Las PBMC se seleccionaron por FSC/SSC (a). Las células vivas se seleccionaron por 7AAD (b). Los monocitos, las células T y las células B se identificaron por selección de células CD14+, CD3+ y CD19+, respectivamente (c). El histograma muestra la superposición de la expresión de DC-STAMP en poblaciones CD14+ (línea gris clara), CD3+ (línea negra) y CD19+ (línea gris). Un pequeño porcentaje de CD3+ son DC-STAMP+ (indicado por la flecha). Se muestra la expresión relativa de DC-STAMP y CD3 en PBMC humanas (d). La Figura 16C muestra la expresión de DC-STAMP en monocitos humanos mostrada por las estrategias de selección por etapas para el análisis de PBMC humanas con un cóctel de anticuerpos compuesto de 10 anticuerpos. Se seleccionaron PBMC totales en FSC y SSC (a); las células muertas se excluyeron por 7AAD (b); las células DC-STAMP+ vivas se seleccionaron como 1A2+ (~14 %) basándose en los controles (c); las células 1A2+ se clasificaron adicionalmente en 4 subseries basándose en la expresión de CD3 y CD19 (d). Dos poblaciones de células 1A2+ principales, CD3-CD19- (31,9 %) y CD3+CD19- (38,4 %) se marcaron por ∞ y *, respectivamente. Las células DC-STAMP+ no B, no C (CD3-CD19-1A2+, indicado por ∞ en (d)) se diseccionaron adicionalmente en 4 subseries (Q1, Q2, Q3, Q4) por expresión de CD14 y CD16 (e). La expresión de CD11b y CD11c (i, iii, v, vii) y HLA-DR y CD 15 (ii, iv, vi, viii) en estas 4 subseries se mostraron de (i) a (viii). Los números en cada gráfico de puntos representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada marcador individual. El dato experimental es representativo de 4 muestras independientes.

La Figura 17 muestra que las PBMC humanas tienen cuatro patrones de expresión de DC-STAMP distintos que difieren entre sujetos Ps/PsA y HC. La Figura 17A muestra que se observaron cuatro patrones de expresión de DC-STAMP distintos en PBMC humanas. Se aislaron PBMC de una cohorte de sujetos humanos (>100) y se tiñeron con el anticuerpo 1A2-FITC. Las células muertas se excluyeron por 7-ADD. Véase en la Tabla 3 el criterio de clasificación de estos patrones. La Figura 17B muestra el número de sujetos observados en cada patrón. El ensayo exacto de Fisher muestra una diferencia significativa entre HC, Ps y PsA en los patrones de

DC-STAMP (valor de $p = 0,0119$). La Tabla 3 resume los patrones de DC-STAMP y la distribución de pacientes HC y Ps/PsA en esos cuatro patrones.

La Figura 18 muestra que DC-STAMP está regulado negativamente en monocitos humanos durante la osteoclastogénesis. La Figura 18A muestra cambios dinámicos de expresión en la superficie de DC-STAMP en monocitos humanos durante la osteoclastogénesis. Se cultivaron monocitos humanos enriquecidos en medio suplementado con RANKL y M-CSF, y se examinó la expresión en la superficie de DC-STAMP en diferentes puntos de tiempo (a: día0, b: día1, c: día2, d: día5, e: día7). Las líneas continuas en cada panel representan el nivel de expresión de DC-STAMP original en monocitos recientes y las líneas abiertas muestran la expresión de DC-STAMP en los diversos puntos de tiempo. La Figura 18B muestra imágenes que demuestran la localización celular de DC-STAMP. Se cultivaron monocitos humanos con RANKL+M-CSF durante 8 días, se fijaron y se inmunotifieron con DAPI que se une a los núcleos, 1A2 anti-DC-STAMP-FITC, y faloidina rodamina para la actina. Las imágenes muestran la localización de DC-STAMP en un pro-OC con forma de huso (a) y en OC maduros (b). Las células mostradas en (a) y (b) se cultivaron en un solo portaobjetos con los mismos aumentos. Las imágenes son representativas de células frecuentes con fenotipos similares (mononucleares frente a multinucleadas y forma de huso frente a forma redonda grande).

La Figura 19 muestra que las células DC-STAMP^{high} demuestran un mayor potencial de osteoclastogénesis. La Figura 19A muestra una estrategia de selección de monocitos humanos basándose en la expresión de DC-STAMP. Se enriquecieron monocitos humanos por selección negativa, se tñeron con 1A2-FITC y se clasificaron en DC-STAMP^{high} y DC-STAMP^{low} (1,9 % y 1,8 % del máximo y mínimo). La Figura 19B muestra imágenes de la actividad de resorción ósea de células DC-STAMP^{high} y DC-STAMP^{low}. Se cultivaron células DC-STAMP^{high} y DC-STAMP^{low} clasificadas mostradas en (A) con obleas de hueso durante 14 días en presencia de RANKL y M-CSF. Los números entre paréntesis representan el número total de OC TRAP+ por 10^3 células clasificadas. Se mostraron OC y cavidades de erosión en las obleas de hueso por células DC-STAMP^{low} y DC-STAMP^{high} en (a y b) y (c y d) respectivamente. Representantes de tres experimentos individuales realizados en HC.

La Figura 20 muestra que las proteínas DC-STAMP están fosforiladas en restos de tirosina y se asocian con CD16 y SHP-1. La Figura 20A muestra lisados celulares de OC, DC y monocitos (M) que se sometieron a inmunoprecipitación (IP) con mAb 1A2 contra DC-STAMP (a) o mAb contra CD16 (b). Los inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia (IB) con mAb 4G10 anti-fosfotirosina. La Figura 20B muestra lisados celulares de monocitos sometidos a IP con mAb contra DC-STAMP (a) o contra CD16 (b), e IB con mAb 1A2 contra DC-STAMP. La Figura 20C muestra lisados celulares de monocitos que se sometieron a IP con mAb 1A2 anti-DC-STAMP e IB con mAb anti-SHP-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se proporcionan anticuerpos como se definen en las reivindicaciones que se unen específicamente a un epítipo de DC-STAMP. Específicamente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo de DC-STAMP, en donde el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos Glu-Val-His-Leu-Lys-Leu-His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln (SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln (SEQ ID NO: 2). Una cadena ligera del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 5. Una cadena pesada del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 6.

También se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, en donde la composición comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de DC-STAMP, y en donde el epítipo de DC-STAMP comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. El anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 5. El anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 6. El anticuerpo es anticuerpo monoclonal. La composición puede comprender además, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, se proporcionan métodos para inhibir la osteoclastogénesis en una célula. Los métodos comprenden administrar a la célula una composición que comprende un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo bloqueante) que se une específicamente a un epítipo de DC-STAMP. Una cadena ligera del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 5. Una cadena pesada del anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 6. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el epítipo de DC-STAMP comprende la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La composición puede administrarse, por ejemplo, *in vitro* o a un sujeto *in vivo*. La célula puede, por ejemplo, ser una célula de mamífero. Opcionalmente, la célula de mamífero puede ser una célula humana. Las células pueden incluir células progenitoras, células madre, osteoclastos y similares.

Como se una en el presente documento, el término anticuerpo incluye, pero sin limitación, inmunoglobulina entera (es decir, un anticuerpo intacto) de cualquier clase. Los anticuerpos nativos normalmente son glicoproteínas heterotetraméricas compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios separados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V(H)) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera

tiene un dominio variable en un extremo (V(L)) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los restos de aminoácido particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente.

El término variable se usa en el presente documento para describir ciertas partes de los dominios de anticuerpo que difieren en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad normalmente no se distribuye de forma uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Típicamente, se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como en los dominios variables de la cadena pesada. Las partes más conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden, cada uno, cuatro regiones FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas y próximas entre sí por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término epítipo incluye cualquier determinante capaz de interactuar específicamente con los anticuerpos proporcionados. Los determinantes epítipos normalmente consisten en agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activos tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. La identificación del epítipo que reconoce el anticuerpo se realiza como se indica a continuación. En primer lugar, se preparan diversas estructuras parciales de la molécula diana que reconoce el anticuerpo monoclonal. Las estructuras parciales se preparan preparando péptidos parciales de la molécula. Estos péptidos se preparan, por ejemplo, por técnicas de síntesis de oligopéptidos conocidas o mediante la incorporación de un ADN que codifica el polipéptido parcial deseado en un plásmido de expresión adecuado. El plásmido de expresión se libera en un hospedador adecuado, tal como *E. coli*, para producir los péptidos. Por ejemplo, puede prepararse una serie de polipéptidos que tienen longitudes apropiadamente reducidas, trabajando desde el extremo C o N de la molécula diana, mediante técnicas de ingeniería genética establecidas. Al establecer qué fragmentos reaccionan con el anticuerpo, se identifica la región del epítipo. El epítipo se identifica de forma más precisa mediante la síntesis de una diversidad de péptidos pequeños o mutantes de los péptidos usando técnicas de síntesis de oligopéptidos establecidas. Los péptidos más pequeños se usan, por ejemplo, en un ensayo de inhibición competitiva para determinar si un péptido específico interfiere con la unión del anticuerpo a la molécula diana. Si es así, el péptido es el epítipo al que se une el anticuerpo. Pueden usarse kits disponibles en el mercado, tales como el Kit SPOTs (Genosys Biotechnologies, Inc., The Woodlands, TX) y una serie de kits de síntesis de péptidos en multipines basándose en el método de síntesis en multipines (Chiron Corporation, Emeryville, CA) para obtener una gran diversidad de oligopéptidos.

El término anticuerpo o fragmentos del mismo también puede incluir anticuerpos quiméricos y anticuerpos híbridos, con especificidades de antígeno o epítipo duales o múltiples, y fragmentos tales como F(ab')₂, Fab', Fab y similares, incluyendo fragmentos híbridos. De esta manera, se proporcionan fragmentos de los anticuerpos que conservan la capacidad de unirse a sus antígenos específicos. Por ejemplo, dentro del significado del término anticuerpo o fragmento del mismo se incluyen fragmentos de anticuerpos que mantienen la actividad de unión a DC-STAMP. Dichos anticuerpos y fragmentos pueden obtenerse por técnicas conocidas en este campo y pueden seleccionarse con respecto a la especificidad y actividad de acuerdo con métodos generales para producir anticuerpos y explorar la especificidad y actividad de los anticuerpos (véase Harlow and Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York (1988)).

Dentro del significado de anticuerpos o fragmentos de los mismos también se incluyen conjugados de fragmentos de anticuerpos y proteínas de unión a antígeno (anticuerpos monocatenarios) como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 4.704.692.

El anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal. El término anticuerpo monoclonal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse

usando métodos de hibridoma tales como los descritos por Kohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975) o Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York (1988). En un método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado típicamente se inmuniza con un agente de inmunización para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente de inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. El agente de inmunización puede ser DC-STAMP o un fragmento inmunogénico del mismo.

En general, se usan linfocitos de sangre periférica (PBL) en métodos para producir anticuerpos monoclonales si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Los linfocitos después se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, páginas 59-103 (1986)). Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, incluyendo células de mieloma de origen de roedor, bovino, equino y humano. Normalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT") como sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas de células inmortalizadas útiles en el presente documento son las que se fusionan eficazmente, soportan un alto nivel de expresión estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas de células inmortalizadas incluyen líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, Calif, y la American Type Culture Collection; Rockville, Md. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, páginas 51-63 (1987)).

El medio de cultivo en que se cultivan las células de hibridoma después puede ensayarse con respecto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra DC-STAMP o epítomos seleccionados de los mismos. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica y se describen adicionalmente en Harlow and Lane Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988).

Después de que se han identificado las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por dilución limitante de procedimientos de clasificación FACS y crecimiento por métodos convencionales. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco y Medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o el líquido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse por métodos de ADN recombinantes, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma pueden servir como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que después se introducen por transfección en células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de plasmacitoma o células de mieloma que, de otra manera, no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567) o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es inmunoglobulina puede sustituir a los dominios constantes de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, o puede sustituir a los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígenos que tiene especificidad por DC-STAMP y otro sitio de combinación de antígenos que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos

- para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos de Fab, puede realizarse usando técnicas rutinarias conocidas en este campo. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Se describen ejemplos de digestión con papaína en el documento WO 94/29348, la Patente de Estados Unidos N.º 4.342.566, y Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988). La digestión con papaína de anticuerpos típicamente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento, denominado el fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.
- 10 Los fragmentos Fab producidos en la digestión de anticuerpos también pueden contener los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra de anticuerpo. El fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro a la región de bisagra. Fab'-SH es la denominación del presente documento para un Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre.

- Un método para producir proteínas que comprenden los anticuerpos o polipéptidos proporcionados es unir dos o más péptidos o polipéptidos entre sí por técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden sintetizarse químicamente usando un equipo de laboratorio disponible actualmente usando la química de Fmoc (9-fluorenilmetil-oxicarbonilo) o Boc (*tert*-butiloxicarbonilo) (Applied Biosystems, Inc.; Foster City, CA). Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente al anticuerpo proporcionado en el presente documento, por ejemplo, puede sintetizarse por reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido o polipéptido puede sintetizarse y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un anticuerpo puede sintetizarse y posteriormente escindirse de la resina, exponiendo de esta manera un grupo terminal que está bloqueado funcionalmente en el otro fragmento. Por reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos pueden unirse covalentemente a través de un enlace peptídico por su extremo carboxilo y amino, respectivamente, para formar un anticuerpo o un fragmento del mismo. (Grant, *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky and Trost, Ed., *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag Inc., NY (1993)). Como alternativa, el péptido o polipéptido puede sintetizarse independientemente *in vivo*. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un anticuerpo o fragmento del mismo a través de reacciones de condensación de péptidos similares.

- Por ejemplo, el ligamiento enzimático de segmentos peptídicos clonados o sintéticos puede permitir que los fragmentos peptídicos relativamente cortos se unan para producir fragmentos peptídicos de mayor tamaño, polipéptidos o dominios de proteína completa (Abrahmsen et al., *Biochemistry*, 30: 4151 (1991)). Como alternativa, puede utilizarse el ligamiento químico nativo de péptidos sintéticos para construir de forma sintética grandes péptidos o polipéptidos a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este método consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson et al. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266: 776-9 (1994)). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un tioéster de un péptido sintético no protegido con otro segmento peptídico no protegido que contiene un resto de Cys amino terminal para dar un intermedio ligado a tioéster como producto covalente inicial. Sin cambio en las condiciones de reacción, este intermedio se somete a una reacción intramolecular rápida y espontánea para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de unión. La aplicación de este método de ligamiento químico nativo a la síntesis total de una molécula de proteína se ilustra por la preparación de la interleucina 8 (IL-8) humana (Baggiolini et al., *FEBS Lett.* 307: 97-101 (1992); Clark et al., *J. Biol. Chem.* 269: 16075 (1994); Clark et al., *Biochemistry* 30: 3128 (1991); Rajarathnam et al., *Biochemistry* 33: 6623-30 (1994)).

- Como alternativa, pueden unirse químicamente segmentos peptídicos no protegidos cuando el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado del ligamiento químico es un enlace no natural (no peptídico) (Schmolzer et al., *Science* 256: 221 (1992)). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios de proteína, así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle et al., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, New York, páginas 257-67 (1992)).

- Los fragmentos polipeptídicos proporcionados pueden ser proteínas recombinantes obtenidas por clonación de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido en un sistema de expresión capaz de producir los fragmentos polipeptídicos del mismo, tales como sistemas de expresión bacterianos, de adenovirus o de baculovirus. Por ejemplo, se puede determinar el dominio activo de un anticuerpo a partir de un hibridoma específico que puede causar un efecto biológico asociado con la interacción del anticuerpo con DC-STAMP. Por ejemplo, pueden delecionarse aminoácidos que se ha observado que no contribuyen a la actividad o especificidad de unión o afinidad del anticuerpo sin pérdida en la actividad respectiva.

- Los fragmentos proporcionados, si están unidos a otras secuencias, también pueden incluir inserciones, delecciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no se vea alterada o perjudicada significativamente en comparación con el anticuerpo o epitopo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar algunas propiedades adicionales,

tales como retirar o añadir aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro, aumentar su longevidad biológica, alterar sus características de secreción y similares. En cualquier caso, el fragmento puede poseer una propiedad bioactiva, tal como una actividad de unión, regulación de la unión en el dominio de unión, y similares. Las regiones funcionales o activas pueden identificarse por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido de la expresión y ensayo del polipéptido expresado. Dichos métodos son fácilmente evidentes para un experto en la materia y pueden incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica el antígeno (Zoller et al., Nucl. Acids Res. 10: 6487-500 (1982)).

También se proporciona en el presente documento una versión humanizada o humana del anticuerpo. Opcionalmente, el anticuerpo modula la actividad de la molécula de DC-STAMP activando o inhibiendo la molécula de DC-STAMP. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado o humano comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo que tiene la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma desvelada en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender todas las CDR de un anticuerpo que tiene la misma especificidad de epítipo que un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma.

Opcionalmente, el anticuerpo humanizado o humano puede comprender al menos un resto de la región marco de las cadenas ligeras o pesadas proporcionadas en la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. Los anticuerpos humanizados y humanos pueden obtenerse usando métodos conocidos por un experto en la materia; por ejemplo, el anticuerpo humano puede producirse usando un animal mutante de la línea germinal o por una biblioteca de presentación en fagos.

Los anticuerpos también pueden generarse en otras especies y humanizarse para administración a seres humanos. Como alternativa, también pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos inmunizando un ratón u otra especie capaz de crear un anticuerpo completamente humano (por ejemplo, ratón genéticamente modificado para producir anticuerpos humanos) y separar clones que se unen a DC-STAMP. Véase, por ejemplo, Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93, (1995). Como se usa en el presente documento, el término humanizado y humano en relación con los anticuerpos, se refiere a cualquier anticuerpo que se espera que induzca una respuesta inmunogénica débil terapéuticamente tolerable en un sujeto humano. De esta manera, el término incluye completamente humanizado o completamente humano, así como parcialmente humanizado o parcialmente humano.

Son formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una CDR del receptor se han reemplazado por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como un ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los restos marco de Fv de las inmunoglobulinas humanas se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se unen ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al., *Nature*, 321: 522-5 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-7 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-6 (1992)).

En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácido no humanos con frecuencia se denominan restos importados, que típicamente se toman de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo los métodos descritos en Jones et al., *Nature* 321: 522-5 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-7 (1988); o Verhoeven et al., *Science* 239: 1534-6 (1988), sustituyendo CDR de roedor o secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se han sustituido por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos proporcionados pueden aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Estas secuencias de nucleótidos también pueden modificarse, o humanizarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567). Las secuencias de nucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos proporcionados pueden expresarse en células hospedadoras apropiadas.

- Estas incluyen células hospedadoras procariotas incluyendo, pero sin limitación, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, otras bacterias de la familia *enterobacteriaceae* tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y diversas especies de *Pseudomonas*. También pueden utilizarse células hospedadoras eucariotas. Estas incluyen, pero sin limitación, células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*) y células de mamífero tales como células VERO, células HeLa, células de ovario de hámster chino (CHO), células W138, células BHK, células COS-7, células 293T y células MDCK. Los anticuerpos producidos por estas células pueden purificarse del medio de cultivo y ensayarse con respecto a la unión, actividad, especificidad o cualquier otra propiedad de los anticuerpos monoclonales utilizando los métodos expuestos en este documento y convencionales en la técnica.
- 10 Pueden emplearse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J(H)) en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dicho ratón mutante de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-5 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-8 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7: 33 (1993)). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). También están disponibles las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, ed., p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)).

- El anticuerpo o fragmento proporcionado puede marcarse o fusionarse con otro polipéptido o fragmento del mismo. Por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con un agente terapéutico. De esta manera, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a DC-STAMP puede unirse a un agente terapéutico. El enlace puede ser covalente o no covalente (por ejemplo, iónico). Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, toxinas, incluyendo, pero sin limitación, toxinas vegetales y bacterianas, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos y proteínas. También se proporcionan proteínas de fusión modificadas por ingeniería genética en las que genes que codifican un anticuerpo o fragmentos del mismo, incluyendo la región Fv, pueden fusionarse con los genes que codifican una toxina para liberar una toxina a la célula diana. Como se usa en el presente documento, una o más células son células DC-STAMP positivas.

- Otros ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes quimioterapéuticos, un agente radioterapéutico y un agente inmunoterapéutico, así como combinaciones de los mismos. De esta manera, el complejo de anticuerpo suministrado al sujeto puede ser multifuncional, ya que ejerce un efecto terapéutico por la unión a DC-STAMP y un segundo efecto terapéutico mediante la liberación de un agente terapéutico complementario.

- El agente terapéutico puede actuar extracelularmente, por ejemplo, iniciando o logrando una respuesta inmunitaria, o puede actuar intracelularmente, directamente por translocación a través de la membrana celular o indirectamente, por ejemplo, logrando señalización a través de la membrana celular. El agente terapéutico opcionalmente se puede escindir del anticuerpo o fragmento. La escisión puede ser autolítica, realizarse por proteólisis o efectuarse poniendo en contacto la célula con un agente de escisión. Además, el anticuerpo o fragmentos del mismo también pueden actuar extracelularmente, por ejemplo, iniciando, efectuando, potenciando o reduciendo una respuesta inmunitaria sin asociarse en un complejo molecular con un agente terapéutico. Dicho anticuerpo se conoce en la técnica como anticuerpo no conjugado. Un anticuerpo no conjugado puede inducir directamente una señal de crecimiento negativo o apoptosis o activar indirectamente un mecanismo de defensa de un sujeto para mediar la actividad antitumoral. El anticuerpo o fragmento puede modificarse para potenciar la destrucción celular dependiente de anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos en la región Fc de los anticuerpos o fragmentos desvelados en el presente documento para aumentar la unión de receptores de Fc para aumentar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o aumentar la fagocitosis. El anticuerpo o fragmento también puede usarse para inducir la proliferación celular. Al inducir la proliferación celular, pueden potenciarse los efectos de un agente quimioterapéutico o radioterapéutico descrito en el presente documento.

- Los ejemplos de toxina o restos de toxina incluyen difteria, ricina, estreptavidina y modificaciones de las mismas. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxel, cisplatino, carboplatino, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramina (AMC)), y agentes

antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico a los anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon et al., *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), páginas 243-56 (1985); Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), páginas 623-53 (1987); Thorpe, *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy" in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), páginas 303-16 (1985), y Thorpe et al., *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982). Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo contra DC-STAMP, un anticuerpo contra DC-STAMP humanizado, inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera de un anticuerpo contra DC-STAMP, CDR del anticuerpo contra DC-STAMP y ciertos truncamientos de estos anticuerpos o inmunoglobulinas que realizan las funciones del anticuerpo o inmunoglobulina de longitud completa. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica los anticuerpos contra DC-STAMP puede estar alterada. De tal manera, se desvelan ácidos nucleicos que codifican las secuencias polipeptídicas, variantes y fragmentos de las mismas. Estas secuencias incluyen todas las secuencias degeneradas relacionadas con una secuencia de proteína específica, es decir, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica una secuencia de proteína particular, así como todos los ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos degenerados que codifican las variantes desveladas y derivados de las secuencias de proteína. De esta manera, aunque cada secuencia de ácido nucleico particular puede no estar escrita en el presente documento, se entiende que, en realidad, todas y cada una de las secuencias se desvelan y describen en el presente documento a través de las secuencias de proteína desveladas.

Como ocurre con todos los péptidos, polipéptidos y proteínas, incluyendo fragmentos de los mismos, se entiende que pueden producirse modificaciones adicionales en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos contra DC-STAMP que no alteren la naturaleza o función de los péptidos, polipéptidos o proteínas. Dichas modificaciones incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas y se analizan con mayor detalle más adelante.

Los anticuerpos contra DC-STAMP proporcionados en el presente documento tienen una función deseada. El anticuerpo contra DC-STAMP se une a un epítipo específico de la proteína DC-STAMP. La unión del epítipo puede inhibir, por ejemplo, la osteoclastogénesis.

Los anticuerpos contra DC-STAMP desvelados en el presente documento pueden modificarse y variarse adicionalmente siempre que se mantenga la función deseada. Se entiende que una manera de definir cualquier modificación conocida y derivados o los que podrían surgir a partir de las secuencias de ácido nucleico y proteínas desveladas en el presente documento es mediante la definición de las modificaciones y derivados en términos de identidad con secuencias conocidas específicas. Se desvelan específicamente polipéptidos que tiene al menos un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad con los anticuerpos contra DC-STAMP proporcionados en el presente documento. Los expertos en la materia entenderán fácilmente cómo determinar la identidad de dos polipéptidos. Por ejemplo, la identidad puede calcularse después de alinear las dos secuencias de forma que la identidad llegue a su máximo nivel.

Otra forma de calcular la identidad puede realizarse publicando algoritmos. Un alineamiento óptimo de secuencias con fines comparativos puede realizarse por el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math* 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443 (1970), por la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), por implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

Los mismos tipos de identidad pueden obtenerse para ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante los algoritmos desvelados en Zuker, *Science* 244: 48-52 (1989); Jaeger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7706-10 (1989); Jaeger et al., *Methods Enzymol.* 183:281-306 (1989). Se entiende que típicamente puede usarse cualquiera de los métodos y que, en ciertos casos, los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, pero el experto en la materia debe entender que, si se encuentra identidad con al menos uno de estos métodos, se diría que las secuencias tienen la identidad indicada y estarían desveladas en el presente documento.

Las modificaciones de proteínas incluyen modificaciones de secuencias de aminoácidos. Las modificaciones en la secuencia de aminoácidos pueden producirse de forma natural como variaciones alélicas (por ejemplo, debido al polimorfismo genético) o pueden producirse por intervención humana (por ejemplo, por mutagénesis de secuencias de ADN clonadas), tales como mutantes de punto inducido, delección, inserción y sustitución. Estas modificaciones pueden dar como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos, proporcionar mutaciones silenciosas, modificar un sitio de restricción o proporcionar otras mutaciones específicas. Las modificaciones en la secuencia de aminoácidos típicamente se incluyen en una o más de tres clases: modificaciones de sustitución, inserción o delección. Las inserciones incluyen fusiones amino y/o terminales, así como inserciones intrasecuencia de restos de

aminoácidos individuales o múltiples. Las inserciones normalmente serán inserciones más pequeñas que las de las fusiones amino o carboxi terminales, por ejemplo, del orden de uno a cuatro restos. Las deleciones se caracterizan por la retirada de uno o más restos de aminoácido de la secuencia de proteínas. Típicamente, no se delecionan más de aproximadamente 2 a 6 restos en ningún sitio dentro de la molécula de proteína. Las sustituciones de aminoácidos típicamente son de restos individuales, pero pueden aparecer en varias localizaciones diferentes al mismo tiempo; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácido; y las deleciones variarán de aproximadamente 1 a 30 restos. Las deleciones o inserciones preferentemente se realizan en pares adyacentes, es decir, una deleción de 2 restos o una inserción de 2 restos. Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas pueden combinarse para conseguir una construcción final. Las mutaciones no deben poner la secuencia fuera de la fase de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que puedan producir una estructura de ARNm secundaria. Las modificaciones sustitucionales son aquellas en las que se ha retirado al menos un resto y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Dichas sustituciones generalmente se realizan de acuerdo con la siguiente Tabla 1 y se denominan sustituciones conservativas.

15

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

| Aminoácido | Sustituciones (en la técnica se conocen otras) |
|------------|--|
| Ala | Ser, Gly, Cys |
| Arg | Lys, Gln, Met, Ile |
| Asn | Gln, His, Glu, Asp |
| Asp | Glu, Asn, Gln |
| Cys | Ser, Met, Thr |
| Gln | Asn, Lys, Glu, Asp |
| Glu | Asp, Asn, Gln |
| Gly | Pro, Ala |
| His | Asn, Gln |
| Ile | Leu, Val, Met |
| Leu | Ile, Val, Met |
| Lys | Arg, Gln, Met, Ile |
| Met | Leu, Ile, Val |
| Phe | Met, Leu, Tyr, Trp, His |
| Ser | Thr, Met, Cys |
| Thr | Ser, Met, Val |
| Trp | Tyr, Phe |
| Tyr | Trp, Phe, His |
| Val | Ile, Leu, Met |

Las modificaciones, incluyendo las sustituciones de aminoácidos específicas, se realizan por métodos conocidos. A modo de ejemplo, se realizan modificaciones por mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de esta manera ADN que codifica la modificación, y posteriormente expresando el ADN en el cultivo celular recombinante. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, la mutagénesis inducida por M13 y la mutagénesis por PCR.

En el presente documento se proporcionan métodos para inhibir la osteoclastogénesis en una célula. Dichos métodos incluyen administrar una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos contra DC-STAMP proporcionados en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos contra DC-STAMP descritos en el presente documento. Las composiciones proporcionadas en el presente documento son adecuadas para administración *in vitro* o *in vivo*. Opcionalmente, las composiciones que comprenden los anticuerpos contra DC-STAMP pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por vehículo farmacéuticamente aceptable se entiende un material que no es indeseable biológicamente y de otra manera, es decir, el material se administra a un sujeto sin provocar efectos biológicos indeseables o interactuar de una manera perjudicial con los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se selecciona para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

Se describen vehículos adecuados y sus formulaciones en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos de los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua estéril, solución salina, soluciones tamponadas tales como solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución generalmente es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 7 a 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen los polipéptidos inmunogénicos. Las matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, liposomas

o micropartículas. Ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y concentración de la composición que se esté administrando. Los vehículos son los adecuados para la administración de la composición, por ejemplo, los polipéptidos descritos en el presente documento y el adenovirus que codifica un antígeno, a seres humanos u otros sujetos.

5 Las composiciones se administran de varias formas dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico y del área a tratar. Las composiciones se administran a través de cualquiera de varias vías de administración, incluyendo la vía tópica, oral, parenteral, intravenosa, intra-articular, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, transdérmica, intrahepática, intracraneal, nebulización/inhalación, o por instilación a través de
10 broncoscopia.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen emulsiones, suspensiones y soluciones estériles acuosas o no acuosas. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los
15 vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. Opcionalmente están presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes,
20 y gases inertes y similares.

Las formulaciones para administración tópica incluyen pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Opcionalmente son necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares.

25 Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres o comprimidos. Opcionalmente son deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

30 Opcionalmente, las moléculas de ácido nucleico o polipéptidos se administran por un vector que comprende la molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo contra DC-STAMP. Hay varias composiciones y métodos que pueden usarse para liberar las moléculas de ácido nucleico y/o polipéptidos a las células, *in vitro* o *in vivo*, a través de, por ejemplo, vectores de expresión. Estos métodos y composiciones pueden romperse principalmente en dos clases: sistemas de liberación basados en virus y sistemas de liberación no
35 basados en virus. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y son fácilmente adaptables al uso con las composiciones y métodos descritos en el presente documento.

Como se usan en el presente documento, los plásmidos o vectores virales son agentes que transportan los ácidos nucleicos desvelados al interior de la célula sin degradación indeseada e incluyen un promotor que produce la
40 expresión de la molécula de ácido nucleico y/o un polipéptido adaptador en las células en las que se va a liberar. Son vectores virales, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes, Vaccinia virus, poliovirus, Sindbis y otros virus de ARN, incluyendo estos virus con la cadena principal de VIH. También es preferida cualquier familia viral que comparta las propiedades de estos virus, lo cual hace que sean adecuadas para uso como vectores. Se describen vectores retrovirales en general por Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
45 (1997). Se ha descrito la construcción de adenovirus con defectos de replicación (Berkner et al., *J. Virology* 61: 1213-20 (1987); Massie et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 2872-83 (1986); Haj-Ahmad et al., *J. Virology* 57: 267-74 (1986); Davidson et al., *J. Virology* 61: 1226-39 (1987); Zhang et al., *BioTechniques* 15: 868-72 (1993)). El efecto beneficioso y el uso de estos virus como vectores es que están limitados en el grado en el que pueden extenderse a otros tipos celulares, ya que pueden replicarse dentro de una célula infectada inicial, pero no pueden formar nuevas
50 partículas virales infecciosas. Se ha demostrado que los adenovirus recombinantes consiguen una alta eficacia después de la liberación directa *in vivo* en el epitelio de las vías respiratorias, hepatocitos, endotelio vascular, parénquima del SNC y varios tejidos distintos. Otros sistemas útiles incluyen, por ejemplo, vectores de vaccinia virus capaces de replicarse e incapaces de replicarse y restringidos en cuanto al hospedador.

55 Los anticuerpos contra DC-STAMP proporcionados y/o las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos contra DC-STAMP pueden liberarse a través de partículas de tipo virus. Las partículas de tipo virus (VLP) consisten en una o más proteínas virales derivadas de las proteínas estructurales de un virus. Se describen métodos para fabricar y usar partículas de tipo virus, por ejemplo, en Garcea y Gissmann, *Current Opinion in Biotechnology* 15: 513-7(2004).

60 Los anticuerpos contra DC-STAMP proporcionados pueden liberarse por cuerpos densos subvirales (DB). Los DB transportan proteínas al interior de las células diana por fusión de membranas. Se describen métodos para fabricar y usar DB, por ejemplo, en Pepperl-Klindworth et al., *Gene Therapy* 10: 278-84 (2003).

65 Los anticuerpos contra DC-STAMP proporcionados pueden liberarse por agregados de tegumento. Se describen

métodos para fabricar y usar agregados de tegumento en la Publicación Internacional N.º WO 2006/110728.

Los métodos de liberación que no están basados en virus pueden incluir vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico y secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos adaptadores, en donde los ácidos nucleicos están unidos operativamente a una secuencia de control de la expresión. Las cadenas principales de vector adecuadas incluyen, por ejemplo, las usadas rutinariamente en la técnica tales como plásmidos, cromosomas artificiales, BAC, YAC o PAC. Están disponibles en el mercado numerosos vectores y sistemas de expresión de corporaciones tales como Novagen (Madison, WI), Clontech (Pal Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA), e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA). Los vectores típicamente contienen una o más regiones reguladoras. Las regiones reguladoras incluyen, sin limitación, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, elementos de respuesta, sitios de reconocimiento de proteínas, elementos inducibles, secuencias de unión a proteínas, regiones 5' y 3' no traducidas (UTR), sitios de inicio de la transcripción, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación e intrones.

Pueden obtenerse promotores preferidos que controlan la transcripción a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero procedentes de diversas fuentes, por ejemplo, los genomas de virus tales como polioma, Virus de Simio 40 (SV40), adenovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferentemente, citomegalovirus (CMV), o de promotores de mamífero heterólogos (por ejemplo, promotor de la β -actina o promotor de EF1 α), o de promotores híbridos o quiméricos (por ejemplo, el promotor de CMV fusionado al promotor de la β -actina). También son útiles en el presente documento promotores de la célula hospedadora o especies relacionadas.

Potenciador generalmente se refiere a una secuencia de ADN que funciona a una distancia no fija del sitio de inicio de la transcripción y puede estar en posición 5' o 3' con respecto a la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar dentro de un intrón, así como dentro de la propia secuencia que lo codifica. Normalmente tienen una longitud comprendida entre 10 y 300 pares de bases y funcionan en *cis*. Los potenciadores normalmente funcionan aumentando la transcripción a partir de promotores cercanos. Los potenciadores también pueden contener elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. Aunque se conocen muchas secuencias potenciadoras a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina), típicamente una usará un potenciador de un virus de células eucariotas para la expresión general. Son ejemplos preferidos el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

El promotor y/o el potenciador pueden ser inducibles (por ejemplo, pueden estar regulados química o físicamente). Un promotor y/o potenciador regulado químicamente puede regularse, por ejemplo, por la presencia de alcohol, tetraciclina, un esteroide o un metal. Un promotor y/o potenciador regulado físicamente puede regularse, por ejemplo, por factores ambientales tales como la temperatura y luz. Opcionalmente, la región promotora y/o potenciadora puede actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción a transcribir. En ciertos vectores, la región promotora y/o potenciadora puede ser activa de una manera específica del tipo celular. Opcionalmente, en ciertos vectores, la región promotora y/o potenciadora puede ser activa en todas las células eucariotas, independientemente del tipo celular. Son promotores preferidos de este tipo el promotor de CMV, el promotor de SV40, el promotor de la β -actina, el promotor de EF1 α y la repetición terminal larga retroviral (LTR).

Los vectores también pueden incluir, por ejemplo, orígenes de replicación y/o marcadores. Un gen marcador puede conferir un fenotipo seleccionable, por ejemplo, resistencia a antibióticos, en una célula. El producto marcador se usa para determinar si el vector se ha liberado a la célula y, una vez liberado, se está expresando. Los ejemplos de marcadores de selección para células de mamífero son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, higromicina, puromicina y blasticidina. Cuando dichos marcadores de selección se transfieren satisfactoriamente a una célula hospedadora de mamífero, la célula hospedadora de mamífero transformada puede sobrevivir si se pone bajo presión selectiva. Los ejemplos de otros marcadores incluyen, por ejemplo, el gen lacZ de *E. coli*, la proteína verde fluorescente (GFP) y luciferasa. Además, un vector de expresión puede incluir una secuencia tag diseñada para facilitar la manipulación o detección (por ejemplo, purificación o localización) del polipéptido expresado. Ciertas secuencias Tag, tales como GFP, glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina o tag FLAGTM (Kodak; New Haven, CT) típicamente se expresan como una fusión con el polipéptido codificado. Dichas secuencias tag pueden insertarse en cualquier sitio dentro del polipéptido, incluyendo el extremo carboxilo o amino.

Como se usan en el presente documento, los términos péptido, polipéptido o proteína se usan en sentido amplio para hacer referencia a dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Proteína, péptido y polipéptido también se usan en el presente documento indistintamente para hacer referencia a secuencias de aminoácidos. Debe reconocerse que el término polipéptido no se usa en el presente documento para sugerir un tamaño o número de aminoácidos particular que comprenden la molécula y que un péptido de la invención puede contener hasta varios restos de aminoácido o más.

65

Como se usa a lo largo del presente documento, un sujeto puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, gato, perro, vaca, cerdo, oveja, cabra, ratón, conejo, rata y cobaya), aves, reptiles, anfibios, peces y cualquier otro animal. El término no denota una edad o sexo particular. De esta manera, se pretende incluir sujetos adultos y recién nacidos, tanto del sexo masculino como del sexo femenino.

5 Como se usa en el presente documento, un paciente o sujeto puede usarse indistintamente y el término paciente o sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios.

Se desvelan materiales, composiciones y componentes que pueden usarse para, pueden usarse junto con, pueden usarse en la preparación para, o son productos de los métodos y composiciones desvelados. Estos y otros
10 materiales se desvelan en el presente documento y se entiende que cuando se desvelan combinaciones, subseries, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, aunque no se desvele explícitamente la referencia a cada una de las diversas combinaciones individuales y colectivas y permutaciones de estos compuestos, se considera que todos ellos están contemplados y descritos específicamente en el presente documento. Por ejemplo, si se desvela y analiza un método y se analizan varias modificaciones que pueden realizarse en varias moléculas que incluye el
15 método, se contemplan específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del método, y las modificaciones que son posibles, a menos que se indique específicamente lo contrario. De forma similar, también se contempla y desvela específicamente cualquier subserie o combinación de estas. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta divulgación incluyendo, pero sin limitación, etapas en métodos que usan las composiciones desveladas. De esta manera, si hay una diversidad de etapas adicionales que puedan realizarse, se entiende que
20 cada una de estas etapas adicionales puede realizarse con cualquier etapa de método o combinación de etapas de método específica de los métodos desvelados, y que cada una de estas combinaciones o subseries de combinaciones se contempla específicamente y debe considerarse desvelada.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: Aislamiento de un nuevo anticuerpo monoclonal contra DC-STAMP y el papel de DC-STAMP en la osteoclastogénesis.

Métodos generales

30 Reactivos. Se obtuvieron citocinas RANKL recombinante, M-CSF, IL-4 y GM-CSF en Cell Sciences (Canton, MA), el IFN- α se adquirió en PBL Biomedical Laboratories (Piscataway, NJ). El vector de adenovirus recombinante que contenía el ADNc de mIFN- α de subtipo 5 (Ad-IFN- α) se propagó como se ha descrito previamente (Mathian et al., J. Immunol. 174: 2499-506 (2005)). Los anticuerpos anti-murinos usados incluyen: anti-CD16/CD32 para bloquear los
35 receptores de Fc (BD Pharmingen; San José, CA), CD11b-APC clon M1/70 (BD Pharmingen), CD4-PE clon RM2504 (Caltag; Burlingame, CA), CD8 α -PE/Cy5 clon 53-6.7 (Biolegend; San Diego, CA), Gr-1-APC/Cy7 clon RB6-8C5 (Biolegend), STAT1-PE pY701 (BD Biosciences) y CD11c-PE Cy5.5 clon N418 (eBioscience; San Diego, CA). El anticuerpo policlonal de conejo anti-DC-STAMP de ratón clon KR104 se adquirió en Cosmo Bio (Tokyo, Japan), y el control de isotipo de IgG de ratón se obtuvo en Caltag. Los anticuerpos anti-humanos usados incluyen: CD14-APC
40 clon M5E2 (BD Biosciences), CD44-PE/Cy5 clon IM7, SIRP α -PE/Cy7 clon SE5A5, CD47-PerCP/Cy5.5 clon CC2C6, y CD9-PE clon HI9a (Biolegend).

Animales: Se obtuvieron ratones New Zealand Black (NZB) x New Zealand White (NZW) F1 y NZW/LacJ en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los experimentos se realizaron en ratones hembra NZBxNZW F2 de 2, 5 y 9
45 meses de edad y en controles hembra NZA/LacJ de edad similar. También se adquirieron ratones C57B1/6 y Balb/c en Jackson Laboratories. La línea 3647 de los ratones TNF-Tg (Keffer et al., EMBO J. 10: 4025-31 (1991)), se obtuvo originariamente del Dr. G. Kollias (Institute of Immunology, Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming, Vari, Greece) y se mantiene como heterocigotos en un fondo C57B1/6. Los experimentos se realizaron en ratones hembra de 6 meses de edad TNF-Tg y sus compañeros de camada no transgénicos se utilizaron como
50 controles.

Cultivo celular: Se obtuvieron células del linaje de monocitos/macrófagos murinos RAW 264.7 de la ATCC (Manassas, VA). Se obtuvieron células de médula ósea murina como se ha descrito previamente (Takeshita et al., J. Bone Miner. Res. 15: 1477-88 (2000)) lavando abundantemente fémures y tibias de ratones con solución salina
55 tamponada con fosfato 1X (PBS) estéril. Los esplenocitos se obtuvieron por homogeneización del bazo en un filtro de células en un tubo que contenía PBS 1X. Todos los órganos se diseccionaron del ratón usando una técnica aséptica. Se retiraron los glóbulos rojos (RBC) de las suspensiones celulares usando tampón de lisis ACK (BioWhittaker; Walkersville, MD). Se cultivaron células derivadas de médula ósea y esplenocitos en medio esencial mínimo con modificación alfa (alfa-MEM, Invitrogen; Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal inactivo
60 térmicamente al 10 % (FCS, Hyclone Laboratories; Logan, UT), penicilina/estreptomina al 5 % y medio esencial mínimo al 5 % con aminoácidos no esenciales (Invitrogen) con un pH final de 7.4. Se añadió M-CSF (50 ng/ml) a las células derivadas de médula ósea durante 3 días para enriquecer la población de CD11b+ adherente como se ha descrito previamente (Hayashi et al., J. Biol. Chem. 277: 27880-6 (2002)). Se añadieron otras citocinas a las células derivadas de médula ósea enriquecidas en CD11b+, células RAW 264.7 o esplenocitos, si era necesario para el
65 experimento específico. Las células RAW 264.7, células de médula ósea y esplenocitos en el medio de cultivo se

incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

Osteoclastogénesis ex vivo e in vitro y generación de mDC. Para generar osteoclastos (OC) *ex vivo*, se añadieron 10 ng/ml de M-CSF y 5 ng/ml de RANKL a 2×10^5 esplenocitos en alfa-MEM en placas de 96 pocillos durante 7 días con medio limpio y se añadieron citocinas cada 2 días. Se generaron OC a partir de 2×10^5 células derivadas de médula ósea CD11b+ después de 3 días de cultivo con M-CSF añadiendo 100 ng/ml de RANKL en alfa-MEM a las células durante 3 días más. Se añadió medio nuevo y citocinas un día sí y otro no. Se generaron OC *in vitro* a partir de células RAW 264.7 añadiendo 100 ng/ml de RANKL a alfa-MEM durante 4 días en placas de 96 pocillos o placas de cultivo de 100 mm. Para estudiar los efectos de IFN- α sobre el desarrollo de OC, se añadió IFN- α (PBL Biomedical Laboratories) a 750 U/ml como se ha descrito previamente (Santini et al., J. Exp. Med. 191: 1777-88 (2000)). Se añadieron medio limpio y citocinas un día sí y otro no. Después, las células se fijaron y se tiñeron con respecto a la actividad fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) usando el Kit Diagnostics Acid Phosphatase (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) para identificar OC (células TRAP+ con >3 núcleos) que se cuantificaron como área de OC como se ha descrito previamente (Flick et al., J. Orthop. Res. 21: 676-84 (2003)).

Para la generación de mDC, se cultivaron 2×10^5 células de médula ósea durante 3 días con 50 ng/ml de M-CSF para enriquecer la población CD11b+ adherente como se ha descrito previamente (Hayashi et al., J. Biol. Chem. 277: 27880-6 (2002)). Las células derivadas de médula ósea CD11b+ después se cultivaron en RPMI-1640 (Invitrogen) que contenía 20 ng/ml de IL-4 y 20 ng/ml de GM-CSF durante 3 días más con medio nuevo y se añadieron citocinas cada dos días. La generación de mDC por este método de cultivo se evaluó por tinción inmunofluorescente para visualizar los procesos dendríticos.

Tinción inmunofluorescente. Se cultivaron células derivadas de médula ósea murinas o PBMC humanas en cubreobjetos de vidrio en placas de 12 pocillos con citocinas apropiadas. Las células se fijaron en PFA al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente para la tinción inmunofluorescente. Después, las células se bloquearon y permeabilizaron con PBS que contenía BSA al 0,2 % y saponina al 0,1 % durante 15 minutos. Los cubreobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en una cámara húmeda, después de lo cual se añadieron anticuerpos, DAPI o faloidina durante 45 minutos a temperatura ambiente en la solución de bloqueo y permeabilización. Después de la incubación, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos para obtener imágenes. Las imágenes después se ensamblaron, se pseudo-colorearon y se superpusieron usando el software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems; San José, CA).

Histología. Se fijaron huesos largos de una pata de cada ratón en formalina tamponada con fosfato al 10 %, se descalcificaron en solución de EDTA al 10 % durante dos semanas a temperatura ambiente con agitación suave y se incluyeron en parafina. Se prepararon secciones de histología a partir de tres secciones contiguas de 3 μ m separadas por 500 μ m, que se tiñeron con hematoxilina y azul alcian/orange G (ABH/orange G) o para TRAP usando el Kit Diagnostics Acid Phosphatase (Sigma) como se ha descrito previamente (Flick et al., J. Orthop. Res. 21: 676-84 (2003)). Los OC se cuantificaron a partir de las secciones teñidas con TRAP como se ha descrito previamente usando el sistema de software de análisis de imágenes Osteomeasure (Osteometrics; Atlanta, GA) y se expresaron como número de OC por mm de hueso o superficie de placa de cultivo (Flick et al., J. Orthop. Res. 21: 676-84 (2003)).

Generación de un nuevo anticuerpo monoclonal contra DC-STAMP. Se generó un anticuerpo monoclonal (mAb) contra DC-STAMP inmunizando ratones con un péptido de catorce aminoácidos (Glu-Val-His-Leu-Lys-Leu-His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln (SEQ ID NO: 1)) que compartía homología con una secuencia presente en el cuarto dominio extracelular de DC-STAMP tanto murino como humano. Los clones de hibridoma con fuertes señales por EIA generados por este procedimiento de inmunización se expandieron en medio sin suero SAFC EX-CELL 610 HSF (Sigma; St. Louis, MO) y se usaron para generar anticuerpos, que se purificaron usando columnas HiTrap de proteína G y PD10 (GE Healthcare Biosciences; Piscataway, NJ). El clon 1A2 de este proceso se evaluó y se usó para todos los análisis a causa de su fuerte respuesta EIA y alto rendimiento después de la purificación. El isotipo del clon 1A2 se determinó usando el Kit Isostrip Monoclonal Antibody Isotyping de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA). La conjugación con FITC se realizó usando el kit de marcaje de Molecular Probes (Invitrogen).

Inmunotransferencia. El mAb contra DC-STAMP se usó para inmunoprecipitar DC-STAMP en células cultivadas. El Kit de Extracción de Proteína de Membrana Nativa (Calbiochem; San Diego, CA) se usó para extraer las proteínas de la fracción de la membrana de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas de la fracción de membrana extraídas se inmunoprecipitaron usando perlas de Gel de Afinidad de Proteína A EzView Red (Sigma) después de la incubación durante 1 hora a 4 °C como mAb anti-DC-STAMP para formar complejos de anticuerpo-antígeno.

Después de la inmunoprecipitación, se realizó inmunotransferencia cargando la proteína inmunoprecipitada sobre un gel al 10 % para SDS-PAGE. Las proteínas separadas se transfirieron sobre una membrana de PVDF usando un método de transferencia en húmedo. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 5 % (Sigma) en TBST. Después, se añadió el mAb contra DC-STAMP clon 1 A2,

anticuerpo policlonal de conejo anti-DC-STAMP de ratón disponible en el mercado clon KR104, o IgG de ratón a una dilución 1:1000 en la solución de bloqueo durante una noche a 4 °C. Después de los lavados en TBST, se añadió conjugado de IgG de cabra anti-ratón con peroxidasa de rábano picante (BioRad) a una dilución 1:3000, seguido de más lavados con TBST. Las manchas de transferencia se revelaron con el kit de sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Pierce; Rockford, IL) y se obtuvieron imágenes en películas científicas Kodak (Eastman Kodak; Rochester, NY).

Citometría de flujo y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Se realizó tinción de la proteína de superficie en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) murinas y células RAW 264.7 o células de médula ósea murinas cultivadas con citocinas según fue apropiado para el experimento. Se obtuvo sangre periférica por punción cardíaca y se puso en un tubo con EDTA al 0,5 % para impedir la coagulación. Después se separaron los glóbulos rojos (RBC) de las PBMC con tampón de lisis ACK. Se añadieron anti-CD16/CD32 a las PBMC para bloquear los receptores de Fc durante 15 minutos. Después se tiñeron las PBMC en la oscuridad en hielo con mAb anti-DC-STAMP como conjugado con FITC durante 30 minutos en PBS 1X que contenía FCS al 4 % (para citometría de flujo) o PBS 1X estéril sin FCS (para FACS). También se añadieron 7AAD (Invitrogen) a algunas células durante la incubación de 30 minutos, y se usó para determinar la selección para el análisis posterior de la expresión de la proteína DC-STAMP en la superficie. La permeabilización de las células para la tinción interna se realizó usando el kit Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences). Se usaron CD11b-APC clon M1/70, CD11c-PE Cy5.5 clon N418, CD4-PE clon RM2504, CD8 α -PE/Cy5 clon 53-6.7, STAT1pY701-PE y Gr-1-APC/Cy7 clon RB6-8C5 para el análisis de citometría de flujo multicolor murino. Se usaron CD14-APC clon M5E2, CD44-PE/Cy5 clon IM7, SIRP α -PE/Cy7 clon SE5A5, CD47-PerCP/Cy5.5 clon CC2C6 y CD9-PE clon H19a para el análisis de citometría de flujo multicolor humano. Si las células no podían analizarse por citometría de flujo el mismo día, se fijaban en PFA al 1 % y se analizaban al día siguiente. La citometría de flujo se realizó usando un FACS Calibur o un LSR II (Becton Dickinson). El FACS se realizó el mismo día de la tinción usando un FACS Vantage o un FACS Aria (Becton Dickinson). El análisis de los datos se realizó con el software WinMDI 2.9 (Scripps Research Institute; La Jolla, CA).

Artritis inducida por suero (SIA) y tratamiento *in vivo* con Ad-IFN- α . Se obtuvo suero artrítico de ratones K/BxN (Kouskoff et al., Cell 87: 811-22 (1996)). El suero se evaluó con respecto a la capacidad de inducir artritis por inyección intraperitoneal (IP) de ratones Balb/c (Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME), que son una cepa muy susceptible a SIA. Se administró suero en PBS a ratones NZW y NZBxNZW F1 por inyección IP a una dosis de 250 μ l por ratón durante 5 días, después de lo cual se recogieron los bazo, la sangre y las extremidades para el análisis posterior. Un título de 1×10^{11} partículas víricas/ml en PBS se inyectó retro-orbitalmente en ratones 2 días antes que el suero artrítico y 7 días antes de recoger los bazo, la sangre y las extremidades para un análisis adicional.

Evaluación volumétrica de erosión ósea a través de micro-CT. El volumen de hueso se cuantificó a través de micro-CT *in vivo* de alta resolución (VivaCT 40; Scanco, Southeastern, PA) como se ha descrito previamente (Proulx et al., Arthritis Rheum. 56: 4024-37 (2007)). En resumen, cada articulación se exploró a una resolución isotrópica de 17.5 μ m en un soporte de muestra a medida a 55 keV, con modo de haz cónico. Los datos se reconstruyeron mediante el software Scanco en archivos Dicom para el análisis. Se usó el software Amira 3.1 para segmentar y visualizar los huesos de la articulación del tobillo o la rodilla en las exploraciones micro-CT. Los huesos se marcaron específicamente usando el elemento Segmentation Editor. Se estableció un umbral de densidad >11.000 AU como hueso representativo, y los marcadores se reconstruyeron usando el módulo SurfaceGen para visualizar el hueso. El umbral se mantuvo constante a lo largo de todo el estudio. Como se explora el hueso entero, su volumen, como se determina a partir del módulo TissueStatistics, se usó como medida cuantitativa de la erosión ósea.

ELISA de IFN- α . Se usó el kit ELISA de IFN- α de ratón (PBL Biomedical Laboratories) para evaluar la producción de IFN- α por células transfectadas con el vector Ad-IFN- α . El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en sobrenadantes de células 293T cultivadas en medio con 1×10^{11} partículas víricas/ml de Ad-IFN- α o Ad-Null durante 4 días. El sobrenadante de las células no tratadas de control y el sobrenadante de las células tratadas con virus Ad-Null no produjeron IFN- α , mientras que el sobrenadante de las células tratadas con Ad-IFN- α mostró una OD media a 450 nm de $1,089 \pm 0,081$ que corresponde a aproximadamente 641,5 pg/ml. El kit ELISA se usó también para medir los niveles de IFN- α en suero en ratones NZBxNZW F1. Se recogió suero por centrifugación de sangre periférica coagulada a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. No se detectó IFN- α por encima del nivel de fondo en ratones NZBxNZW F1 a pesar de la presencia de proteinuria. Aunque eran inesperados, estos resultados estaban en línea con los descubrimientos previos de que el ELISA para el IFN- α de suero no es fiable (Hua et al., Arthritis Rheum. 54: 1906-16 (2006)).

ELISA de anticuerpo anti-ADNs. Para medir los títulos de anticuerpo contra ADNs en el suero de ratones NZBxNZW F1 y NZW en todos los grupos de tratamiento, se obtuvo sangre periférica por punción cardíaca y se dejó coagular. La sangre coagulada después se centrifugó a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos para separar el suero de los componentes celulares. El suero después se transfirió a un nuevo tubo y se usó con un kit ELISA de Ig total de ADNs de ratón (Alpha Diagnostic International; San Antonio, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico. Los datos se presentan como media \pm error típico de la media. Se realizaron pruebas *t* de Student o análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significado de $P < 0,05$. La regresión lineal y el análisis chi-cuadrado se realizaron con un nivel de confianza mínimo del 95 %. Los parámetros estadísticos se calcularon usando el software Microsoft Excel 9.0 (Microsoft; Redmond, WA) o el paquete de software GraphPad PRISM 5 (GraphPad Software; La Jolla, CA).

RESULTADOS

Un nuevo anticuerpo monoclonal para detectar la expresión en la superficie de DC-STAMP en OCP. Para estudiar la expresión de proteínas en la superficie, se generó un mAb contra un péptido en el cuarto dominio extracelular de DC-STAMP. Para la comparación, se usó un anticuerpo policlonal contra DC-STAMP que ha mostrados histológicamente expresión en la superficie en OC (Kukita et al., J. Exp. Med. 200: 941-6 (2004)). Se cultivaron células CD11b+ durante 2 días con RANKL y se extrajeron proteínas de la fracción de membrana para inmunoprecipitación con el mAb 1A2. La Figura 1A muestra que el clon 1 A2 del mAb reconoce una proteína un poco mayor de 50 kDa en condiciones reductoras (r) que también se reconoce por el anticuerpo policlonal de conejo disponible en el mercado. Los dos anticuerpos también reconocen una proteína de doble peso molecular (~100 kDa) en condiciones no reductoras (nr). Tanto en condiciones reductoras como en condiciones no reductoras, el mAb contra DC-STAMP 1A2 tiene una banda más intensa para la misma cantidad de proteína cargada en cada calle. El análisis de inmunotransferencia de DC-STAMP procedente del lisado de proteína celular total durante el transcurso de la osteoclastogénesis muestra que DC-STAMP aumenta a lo largo del tiempo según maduran las células desde OCP hasta OC en cultivo con RANKL. Los niveles de proteína cathepsina K confirmaron el estado maduro del OC cultivado (Figura 1B). El clon de mAb 1A2 se conjugó con FITC y se usó para determinar si podía detectarse DC-STAMP en la superficie de la membrana sobre células DC11b+ por citometría de flujo. La Figura 2A muestra que células CD11b+ expresan una mayor cantidad media de DC-STAMP por célula en comparación con células CD11b-.

Como se ha mostrado previamente que OCP procede de células de médula ósea CD11b+, se inmunofenotipificaron células de médula ósea DC-STAMP+CD11b+ para una caracterización adicional. Las células DC-STAMP+CD11b+ en médula ósea C57B1/6 expresaban bajos niveles de marcadores de células T CD4 y CD8 (ambos aproximadamente en un 1 %). Por el contrario, los marcadores del linaje mielóide se expresaban de forma más elevada entre esas células. De la población de células de médula ósea DC-STAMP+CD11b+, el 13,5 % eran de superficie CD11c+ y el 83,1 % eran Gr1+ (Figura 2B).

Las condiciones que favorecen la osteoclastogénesis presentan una superficie DC-STAMP diferente y un patrón de expresión de proteínas interno en comparación con las condiciones que soportan la formación de mDC. Al descubrir que la expresión de la proteína de superficie DC-STAMP podía identificar células que tienen potencial osteoclastogénico por citometría de flujo, se determinó el perfil de expresión de DC-STAMP a lo largo del proceso de formación de OC. Como originalmente se descubrió DC-STAMP en mDC, y los OC y mDC comparten un precursor de CD11b+ común, se comparó el perfil de expresión de DC-STAMP en ambos tipos celulares. Para determinar si existía alguna diferencia en el perfil de expresión de DC-STAMP en la superficie en condiciones que promovían OC frente a condiciones que promovían mDC, se trataron células de médula ósea de ratones C57B1/6 con M-CSF durante 3 días para enriquecer la población de monocitos/macrófagos CD11b+ como se ha establecido previamente (Hayashi et al., J. Biol. Chem. 277: 27880-6 (2002)). Estas células después se trataron con RANKL pro-osteoclastogénico o con pro-mDC IL-4 más GM-CSF. Después de 3 días de cultivo, se evaluó el desarrollo de OC a través de tinción con TRAP o de mDC por observación mediante inmunofluorescencia de la formación de procesos dendríticos (Figura 3A). Las células también se inmunofenotipificaron en cada uno de los 3 días en las condiciones pro-OC o pro-mDC para la expresión de CD11b y CD11c. Se ha descrito previamente que mDC presenta un fenotipo CD11b+CD11c+ y se ha notificado que la expresión de CD11c aumenta durante la diferenciación en mDC (Metlay et al., J. Exp. Med. 171: 1753-71 (1990), Adachi et al., Stem Cells 20: 61-72 (2002)). Bajo la exposición a RANKL, se observó un aumento en la proporción de células CD11b+CD11c-, que se ha demostrado que representa una población que contiene OCP (Li et al., Arthritis Rheum. 50: 265-76 (2004)). Por el contrario, hubo una reducción en el porcentaje de esta población en células expuestas a IL-4 y GM-CSF. Sin embargo, el cultivo con IL-4 y GM-CSF aumentó el porcentaje de la población CD11b+CD11c+, como era de esperar (Figura 3B).

Cuando se cultivaron células de médula ósea en condiciones osteoclastogénicas y se analizaron por citometría de flujo, se observó un fuerte pico individual para la expresión en la superficie de DC-STAMP el día uno del cultivo con RANKL expresado de forma bastante homogénea entre el 88 % de las células CD11b+ (Figura 4A). Esto está de acuerdo con el descubrimiento entre las células CD11b+ en sangre periférica murina (Figura 2A). El día dos de cultivo con RANKL, el porcentaje de células CD11b+ que expresaban DC-STAMP en la superficie empezó a reducirse, mientras que una segunda población de D11b+DC-STAMP^{lo} se volvió más prominente. Después de 3 días de cultivo con RANKL, esta población de células DC-STAMP^{lo} inducida por RANKL aumentó a 1/3 de las células cultivadas totales, dejando un 67 % que expresaban el nivel original de DC-STAMP observado el día 1 de cultivo (Figura 4A). Cuando se comparó esta observación con la situación de células cultivadas con IL-4 + GM-CSF, el desplazamiento a células que expresaban una menor cantidad de DC-STAMP en la superficie en comparación con lo observado en el primer día de exposición a IL-4 + GM-CSF se produjo más rápidamente y entre un mayor porcentaje de las células en comparación con el desplazamiento observado en cultivo con RANKL. El día 3 del

cultivo con IL-4 + GM-CSF, casi el 75 % de las células estaba expresando una menor cantidad de DC-STAMP en la superficie en comparación con los niveles del día uno (Figura 4B).

Para determinar lo que puede representar estos desplazamientos en la expresión de DC-STAMP en la superficie, se midieron los niveles internos de DC-STAMP durante el mismo periodo de tiempo en las mismas condiciones de cultivo que el análisis de DC-STAMP en la superficie. La citometría de flujo para la expresión de la proteína DC-STAMP interna reveló que un porcentaje muy bajo de células expresaban DC-STAMP interno después de 1 día de cultivo con RANKL en comparación con el porcentaje que expresaba DC-STAMP interno después de 1 día de cultivo con IL-4 + GM-CSF (Figura 4C y 4D). Un mayor porcentaje de células en condiciones de cultivo pro-mDC expresaba DC-STAMP interno en relación al porcentaje de células en condiciones pro-OC durante los 3 días de cultivo (29 % frente a 18,3 %, respectivamente).

Se observaron descubrimientos similares en monocitos derivados de PBMC humanos tratados con RANKL y M-CSF o IL-4 + GM-CSF. Como ocurre en las células murinas primarias, los monocitos humanos cultivados con RANKL y M-CSF generaron dos poblaciones de células basándose en la expresión en la superficie de DC-STAMP (Figura 5A). También de acuerdo con los datos murinos, cuando se cultivaron con IL-4 + GM-CSF, los monocitos humanos expresaron de forma homogénea menores cantidades de DC-STAMP en la superficie en comparación con el nivel observado cuando estaban recién aislados (Figura 5B). La tinción inmunofluorescente de células cultivadas con RANKL y M-CSF reveló que las células que presentaban la morfología alargada que había resultado ser característica de las células que respondían a estímulos pro-osteoclastogénicos (Takeshita et al., J. Bone Miner. Res. 15: 1477-88 (2000)) habían internalizado DC-STAMP (Figura 5C). La tinción inmunofluorescente de células cultivadas con IL-4 + GM-CSF también reveló DC-STAMP intracelular (Figura 5D). De nuevo, el patrón observado intracelularmente por citometría de flujo en células murinas se replicó por tinción inmunofluorescente de células humanas en las mismas condiciones de cultivo.

Se usó FACS para clasificar OCP cultivadas con RANKL basándose en la expresión en la superficie de DC-STAMP^{hi} y DC-STAMP^{lo} y se realizó citometría de flujo intracelular para determinar si había diferencias en los niveles de DC-STAMP interno entre esas dos poblaciones recién identificadas (Figura 6A). La citometría de flujo para DC-STAMP intracelular demostró que las células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL tenían una mayor MFI de DC-STAMP intracelular en comparación con las células DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL. Hubo un mayor porcentaje de células DC-STAMP^{lo} (59 %) con este nivel de MFI de DC-STAMP intracelular en comparación con el porcentaje de células DC-STAMP^{hi} (11 %).

Características de las células DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} inducidas por cultivo con RANKL. Para caracterizar las células de DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} identificadas recientemente generadas en cultivo en RANKL, se realizó una serie de análisis de fenotipificación. Usando el parámetro de dispersión frontal por citometría de flujo, se observó que las células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL eran mayores que sus homólogas DC-STAMP^{hi} (Figura 7B). Como el análisis de inmunofenotipificación de las células de médula ósea que expresaban CD11b+DC-STAMP revelaba que el 13 % de ellas era CD11c+, se examinó si este marcador de mDC difería entre las células DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} después del cultivo con IL-4 + GM-CSF. Cuando estas células se clasificaron por FACS y se cultivaron con IL-4 + GM-CSF, se descubrió que ambas tenían porcentajes similares de células CD11c+ (87-88 %). Sin embargo, las células DC-STAMP^{hi} pudieron generar un mayor porcentaje de células MHCII+CD11c+ (19 %) en comparación con las células DC-STAMP^{lo} (9,7 %) después del mismo periodo de tiempo en cultivo (Figura 6C). El análisis de inmunofenotipificación de células de médula ósea que expresaban CD11b+DC-STAMP también reveló un alto porcentaje de células Gr1+ entre esta población. Esto debe tenerse en cuenta porque un papel reciente sobre la intervención de DC-STAMP en la diferenciación mielóide en granulocitos y no granulocitos demostró que la expresión de DC-STAMP estaba asociada con la ramificación no granulocítica de células mieloides (Eleveld-Trancikova et al., Leukemia 22: 455-9 (2008)). Las células se compararon basándose en si eran Gr1^{lo}CD11c- o Gr1^{hi}CD11c-. Se descubrió que la expresión de proteínas de fusión DC-STAMP-GFP permitía el crecimiento de las células Gr1^{lo}CD11c- pero inhibía el crecimiento de las células Gr1^{hi}CD11c-. También se ha notificado que el cultivo *ex vivo* de células Gr1^{lo} de sangre periférica con RANKL y M-CSF podía dar lugar a OC (Yao et al., J. Biol. Chem. 281: 11846-55 (2006)). Para ver el patrón de expresión de DC-STAMP de superficie en estas células, se seleccionaron células de sangre periférica en la región de los monocitos como se ha descrito previamente (Sunderkotter et al., J. Immunol. 172: 4410-7 (2004)), y también en portales para células Gr1^{lo}CD11c- y células Gr1^{hi}CD11c- (Figuras 7A y 7B). Las células en el portal de monocitos mostraron una población tanto DC-STAMP^{lo} como DC-STAMP^{hi}. La mayor parte de las células Gr1^{hi}CD11c- eran DC-STAMP^{hi}, siendo solo aproximadamente un 7 % DC-STAMP^{lo}. Por el contrario, la población de Gr1^{lo}CD11c- presentaba tanto células DC-STAMP^{hi} como células DC-STAMP^{lo} (Figura 7C).

RANKL induce las células DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} que muestran diferente potencial osteoclastogénico. La observación inesperada de las poblaciones de DC-STAMP^{hi} de superficie inducidas por RANKL y las poblaciones de DC-STAMP^{lo} de superficie inducidas por RANKL promovió una investigación sobre la posibilidad de la capacidad osteoclastogénica diferencial de estos dos grupos. Para determinar si había una diferencia en la capacidad de las poblaciones de expresión de DC-STAMP alta y baja inducidas por RANKL de generar OC, se cultivaron células RAW 264.7 con RANKL durante 3 días para generar las dos poblaciones. La tinción con TRAP después de la exposición a

RANKL durante 3 días después de la clasificación reveló que solo se formaban OC multinucleados TRAP+ cuando en el cultivo estaba presente la población DC-STAMP^{lo} inducida por RANKL estaba presente. Las células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL cultivadas solas tenían un área de OC media de $2,7 \pm 0,4 \text{ mm}^2$, mientras que el cultivo de células DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL solas no producía OC multinucleados TRAP+. Una relación de cultivo 5 1:1 de DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL con respecto a DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL dio como resultado un área de OC media de $2,8 \pm 1,4 \text{ mm}^2$. Una relación de cultivo 10:1 con las células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL en exceso dio como resultado un área de OC media de $5,8 \pm 0,6 \text{ mm}^2$, mientras que el tener las células DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL en exceso en una relación 10:1 con respecto a las células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL no producía ningún OC TRAP+ multinucleado grande (Figura 8A).

10

Los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL expresan altos niveles de marcador de OC y genes relacionados con la fusión. Para explicar el descubrimiento de que los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL son más capaces de formar células multinucleadas TRAP+ en comparación con sus homólogos DC-STAMP^{hi} inducidos por RANKL, se examinaron diferencias en la expresión de marcadores de OCP entre las dos poblaciones. Si las células DC- 15 STAMP^{lo} inducidas por RANKL efectivamente son la subserie de OCP más osteoclastogénica, entonces sería de esperar que las células expresaran más genes marcadores de OC. Como DC-STAMP es esencial para la fusión de OC, los genes para proteínas que median los procesos de fusión también eran candidatos para el examen de cualquier diferencia en OCP que presentaban una dicotomía en sus perfiles de DC-STAMP en la superficie celular (Chen et al., FEBS Lett. 581: 2181-93 (2007)). La RT-PCR cuantitativa en tiempo real demostró que la expresión del 20 gen *dc-stamp* es significativamente menor en un 60 % en los OCP DC-STAMP^{hi} inducidos por RANKL en comparación con los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL (Figura 8B).

La señalización a través de RANKL induce la expresión de *dc-stamp* en la osteoclastogénesis, y TREM2 es un receptor regulado positivamente por la estimulación por RANKL que se asocia con la proteína adaptadora DAP 12 25 para mediar la multinucleación de OCP (Hehning et al., Sci. Signal 1:ra11 (2008)). El perfilado de expresión génica para *rank* y *trem2* no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los OCP DC-STAMP^{hi} inducidos por RANKL y los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL. De hecho, la expresión de *rank* se redujo en las dos poblaciones por un promedio del 98 %. De manera interesante, y en apoyo de los resultados de la osteoclastogénesis *in vitro*, la expresión de *trap* fue significativamente mayor en 11,3 veces en las células RAW 30 264.7 DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL (Figura 8C). También se examinó la expresión de *oc-stamp*, que según se describió recientemente era esencial para la diferenciación de OC (Yang et al., J. Cell. Physiol. 215: 497-505 (2008)). Se observó un aumento de 21 veces en la expresión de *oc-stamp* en los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL, mientras que se observó únicamente un aumento de aproximadamente 5 veces en el grupo DC-STAMP^{hi} inducido por RANKL (Figura 8C).

35

Para el análisis se eligieron las moléculas importantes implicadas en la fusión durante la osteoclastogénesis, que incluyen CD47, *Sirp α* , CD44 y CD9. Se examinó la expresión génica para estas cuatro moléculas relacionadas con la fusión debido a la cuestión abierta de si DC-STAMP estaba implicado en la regulación de la expresión de estos factores (Chen et al., FEBS Lett. 581: 2181-93 (2007)). Los niveles de expresión génica para *cd9* y *cd47* estaban 40 significativamente regulados positivamente 1,5 y 1,9 veces, respectivamente, en la población DC-STAMP^{lo} inducida por RANKL con respecto a las células RAW 264.7 cultivadas en medio sencillo. Estos marcadores estaban regulados negativamente o permanecían invariables en las células DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL. Los niveles de ARNm de *Sirp α* estaban significativamente más regulados positivamente en la población de DC-STAMP^{hi} inducida por RANKL. Esto debe tenerse en cuenta porque la expresión génica de su ligando, *cd47*, era mayor en el 45 grupo DC-STAMP^{lo}. El nivel de expresión del gen *cd44* era significativamente mayor en las células DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL (Figura 8C).

Se obtuvieron resultados similares en monocitos CD14+ humanos cuando la citometría de flujo demostró una subserie DC-STAMP+ entre células CD14+CD9+, células CD14+CD44+, células CD14+CD47+ y células 50 CD14+*Sirp α* + (Figura 9A). Cuando se cultivaron células CD14+ con RANKL y se clasificaron en grupos DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi}, se encontró una reducción significativa de 15 veces en la expresión de *dc-stamp* en OCP DC-STAMP^{hi} en comparación con OCP DC-STAMP^{lo}. La expresión para *trap* fue significativamente mayor en 2,3 veces en OCP DC-STAMP^{lo} en comparación con OCP DC-STAMP^{hi}. La expresión de *cd9*, *sirp α* y *cd44* también fue mayor en los OCP DC-STAMP^{lo} en comparación con OCP DC-STAMP^{hi}, mientras que la expresión del gen *cd47* era mayor 55 en los OCP DC-STAMP^{hi} (Figura 9B). De nuevo, el par de ligandos *cd47-sirp α* se expresa de forma diferencial entre los dos OCP como se observa en las células RAW 264.7.

La artritis inflamatoria erosiva está asociada con tener un mayor porcentaje de células CD11b+ que expresan DC-STAMP. Para poner estos descubrimientos en el contexto de un IMID, se examinó la expresión en la superficie 60 de DC-STAMP en células CD11b+ en el escenario de una artritis inflamatoria erosiva en la que números elevados de OC dan como resultado la destrucción ósea. Para examinar si existe una diferencia en el porcentaje de OCP CD11b+ que expresan DC-STAMP circulantes en las PBMC de ratones artríticos en comparación con controles no artríticos, se realizó una micro-CT en ratones CD57B1/6 de 20 semanas de edad y de ratones TNF-Tg de las mismas edades y géneros. El análisis micro-CT en la articulación de la rodilla mostró profundas erosiones artríticas

presentes en los ratones TNF-Tg, mientras que no se observaron erosiones en los ratones C57B1/6 (Figuras 10A y 10B). Cuando se analizó el porcentaje de PBMC CD11b⁺ circulantes que también expresaban DC-STAMP en la superficie, se descubrió que había un aumento de aproximadamente 2 veces en esta población entre los animales artríticos en comparación con los animales no artríticos (Figuras 10A y 10B). Se realizó el mismo análisis de
 5 citometría de flujo en PBMC humanas CD14⁺ procedentes de un paciente con RA y un control sano. Como ocurre en el modelo TNF-Tg de artritis inflamatoria erosiva, el paciente RA tenía un porcentaje mucho mayor de células CD14⁺ que también expresaban DC-STAMP en la superficie (Figura 10C y 10D). Además, esta población que expresaba CD-STAMP era DC-STAMP^{lo} en la superficie en comparación con la del control sano que era DC-STAMP^{hi} en la superficie (Figura 10E). Esto indica que la expresión de DC-STAMP en la superficie puede ser un
 10 marcador de OCP en sangre periférica y un mayor porcentaje de OCP que expresan DC-STAMP circulantes está asociado con la enfermedad erosiva.

El IFN- α inhibe la formación de los OCP DC-STAMP^{lo} más osteoclastogénicos y mantiene altos niveles de DC-STAMP en la superficie de una manera dependiente del estadio. Una JA no erosiva en SLE (siglas en inglés
 15 de lupus eritematoso sistémico) puede ser otra característica de lupus mediado por la firma del gen de IFN- α . Se ha demostrado que algunas citocinas solo tienen un efecto anti-osteoclastogénico de una manera dependiente del estadio (Huang et al., *Arthritis Res. Ther.* 5: R49-59 (2003), Sato et al., *J. Exp. Med.* 203: 2673-82 (2006)). Es decir, el efecto puede depender de si la célula es un OCP temprano (antes de la exposición a RANKL) o es un OCP en estadio posterior (después de RANKL).
 20

Se evaluaron los efectos de la exposición de OCP a IFN- α sobre el desarrollo de la población DC-STAMP^{lo}. En contraste con el desarrollo de una población de DC-STAMP^{lo} como se observa con el cultivo con RANKL, el cultivo con IFN- α de células RAW 264.7 durante 4 días no dio como resultado una reducción de la expresión en la superficie de DC-STAMP (Figura 11A). Cuando se precultivaron células RAW 264.7 con RANKL durante 48 horas
 25 seguido de exposición a IFN- α , se observó una población de DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} como en el grupo de cultivo solo con RANKL. Por el contrario, la inducción por RANKL de dos poblaciones de DC-STAMP se suprimió mediante el precultivo de las células con IFN- α durante 48 horas seguido por la exposición a RANKL (Figura 11B). La citometría de flujo intracelular demostró que el porcentaje de células que expresaban DC-STAMP interno era mayor con 3 días de cultivo con RANKL (16 %) que con IFN- α (6 %) (Figura 11C). De esta manera, el IFN- α puede
 30 prevenir la formación de OCP DC-STAMP^{lo} que son más osteoclastogénicos y esto depende de que los OCP se encuentren con IFN- α antes que con RANKL.

Después se examinó si los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL podrían verse afectados por la administración de IFN- α . Sorprendentemente, el cultivo con IFN- α de OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL dio como resultado
 35 el desarrollo de una subserie de células DC-STAMP^{hi}. La capacidad de IFN- α de generar esta población de DC-STAMP^{hi} a partir de un grupo de DC-STAMP^{lo} clasificado se mitigó por el cultivo simultáneo de las células con RANKL e IFN- α (Figura 11D).

Las células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL se desarrollan más rápido a partir de OCP IFNR1^{-/-} en comparación con OCP WT. Al observar estos efectos del IFN- α , se quiso determinar el perfil de expresión de DC-STAMP cuando la señalización de IFN- α es deficiente. Los ratones IFNR1^{-/-} presentaban una osteopenia generalizada como resultado de números elevados de OC (Takayanagi et al., *Nature* 416: 744-9 (2002)). Al contrario de los OCP tratados con IFN- α , los OCP procedentes de ratones IFNR1^{-/-} desarrollaron una población DC-STAMP^{lo} en respuesta a RANKL. De forma interesante, el desarrollo de esta población se produjo más rápido en ratones
 45 IFNR1^{-/-} en comparación con ratones WT. En el día 4 del cultivo, solo 1/3 de los OCP WT se habían vuelto DC-STAMP^{lo} en respuesta a RANKL en comparación con un 50 % en los ratones IFNR1^{-/-} (Figura 11C).

Los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL tienen mayor expresión génica de IFN- α , IFN- β , SOCS1 y SOCS3 y menor pSTAT1 en comparación con los OCP DC-STAMP^{hi} inducidos por RANKL. Después del trabajo que
 50 identificó la producción de IFN- β por OCP, se realizaron estudios que mostraban que SOCS1 y SOCS2 podían contrarrestar el papel inhibitorio del IFN- β durante la osteoclastogénesis (Hayashi et al., *J. Biol. Chem.* 277: 27880-6 (2002)). Por lo tanto, se examinó si existía heterogeneidad en los niveles de expresión para los genes *IFN- β* , *IFN- α* , *SOCS1* y *SOCS3* en DC-STAMP^{lo} inducido por RANKL frente a células DC-STAMP^{hi}. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real reveló niveles de expresión génica significativamente mayores para estos cuatro genes en los OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL más osteoclastogénicos en comparación con los OCP DC-STAMP^{hi} inducidos por
 55 RANKL (Figura 12A). Cuando se compararon los niveles de pSTAT1, un mayor porcentaje (69 %) de OCP DC-STAMP^{hi} inducidos por RANKL expresaban pSTAT1 a un nivel mayor que el observado en macrófagos de médula ósea antes de la exposición a RANKL. Por el contrario, un menor porcentaje (6 %) de OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL mostraron evidencias de fosforilación de STAT1 (Figura 12B).
 60

El co-cultivo de células DC-STAMP^{lo} inducidas por RANKL con células pretratadas con IFN- α da como resultado células multinucleadas TRAP⁺. Se observó la expresión diferencial del interferón del tipo I entre OCP DC-STAMP^{lo} inducidos por RANKL y OCP DC-STAMP^{hi} inducidos por RANKL. La expresión del gen relacionada con

la fusión se redujo tanto en las células DC-STAMP^{hi} inducidas por RANKL como en las células tratadas con IFN- α . Se examinó si las células DC-STAMP^{lo} podían fusionarse con células tratadas con IFN- α como lo hacían las células DC-STAMP^{hi}. Después de tres días de cultivo con RANKL, se observaron células multinucleadas TRAP+ en co-cultivo de OCP DC-STAMP^{lo} clasificados con células que se habían pretratado con IFN- α . El número medio de células multinucleadas TRAP+/pocillo fue comparable entre los co-cultivos de OCP DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} y el co-cultivo de OCP DC-STAMP^{lo} y las células pretratadas con IFN- α (Figura 12C).

Los ratones NZBxNZW F1 con enfermedad de tipo SLE y los ratones NZW tratados con Ad-IFN- α tienen menos PBMC DC-STAMP^{lo} y menos erosiones en el escenario de una artritis inflamatoria. Para ver si los descubrimientos del efecto de IFN- α sobre el desarrollo de las células DC-STAMP^{lo} más osteoclastogénicas podía explicar la artritis no erosiva en caso de SLE, se examinó el desarrollo de células DC-STAMP^{lo} en ratones con la enfermedad de tipo SLE. El modelo NZBxNZW F1 es un modelo murino establecido de SLE y se ha descubierto que tiene indicios de una expresión elevada del gen *IFI202* inducible por IFN- α , lo cual es un marcador de la susceptibilidad a SLE (Rozzo et al., *Immunity* 15: 435-43 (2001), Santiago-Raber et al., *J. Exp. Med.* 197: 777-88 (2003)). Se usó el modelo por transferencia de suero K/BxN para inducir artritis (SIA) en estos animales y controles NZW (sin SLE). La erosión ósea controlada por mediciones del volumen del astrágalo mediante de micro-CT demostró que los ratones NZW desarrollaban erosiones óseas en respuesta a SIA. Por el contrario, los ratones NZBxNZW F1 con marcadores de enfermedad de SLE, tales como proteinuria y altos títulos de auto-anticuerpos anti-ADNs, no presentaban pérdida ósea con SIA. Cuando se examinaron OCP CD11b+ con respecto a la expresión de DC-STAMP, se descubrió que el suero artritogénico inducía una mayor población de DC-STAMP^{lo} en ratones NZW (Figura 13A). Por el contrario, se encontraron menores niveles de células DC-STAMP^{lo} en los ratones NZBxNZW F1, y este porcentaje no aumentaba con SIA (Figura 13B). Para examinar si esta observación era el resultado de un nivel elevado de IFN- α , los ratones NZW se pretrataron con Ad-IFN- α y después se indujo SIA (Figura 13C). La erosión ósea era menos pronunciada en los ratones tratados con Ad-IFN- α en la situación de SIA en comparación con los ratones NZW no tratados con Ad-IFN- α . De manera interesante, la población CD11b+DC-STAMP^{hi} estaba elevada tanto en los ratones NZBxNZW F1 como en los ratones NZW tratados con Ad-IFN- α (Figuras 13B y 13C). El análisis de regresión lineal reveló correlaciones inversas altamente significativas entre el porcentaje de células CD11b+DC-STAMP^{lo} y la expresión del gen *IFI202* inducible por IFN- α ($P < 0,0001$) así como entre células CD11b+DC-STAMP^{lo} y el volumen óseo ($P = 0,0001$). De esta manera, cuanto mayor es la expresión del *IFI202*, menor es el porcentaje de PBMC CD11b+DC-STAMP^{lo}, y cuanto mayor es el porcentaje de células CD11b+DC-STAMP^{lo}, menor es el volumen óseo (Figura 14A y 14B).

Ejemplo 2: Regulación del desarrollo de osteoclastos humanos por proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP)

Métodos generales

Reactivos y anticuerpos. RANKL y MCSF se adquirieron en R&D systems (Minneapolis, MN). Se usó Suero Bovino Fetal Definido (Hyclone) para todos los cultivos. El anticuerpo policlonal contra DC-STAMP KR104 se adquirió en CosmoBio Co., LTD. (Tokyo, Japan). Todos los anticuerpos usados se adquirieron en BD Bioscience (San José, CA). En todos los cócteles de anticuerpo se incluyó 7-amino-actinomicina D (7-AAD) como colorante vital para excluir las células muertas. El cóctel de anticuerpo usado para la Figura 11B incluía 1A2 (FITC), CD16 (PE), CD14 (APC), CD3 (Pacific Blue), CD19 (APC-Cy7) y 7-AAD. El otro cóctel de anticuerpo usado para la Figura 16C estaba compuesto de 1A2 (FITC), HLA-DR (PE-Texas Red), CD14 (Alexa Fluor 700), CD16 (Pacific Orange), CD15 (Pacific Blue), CD11b (APC-Cy7), CD11c (PE-Cy7), CD 19 (PE), CD3 (APC) y 7-AAD. Las células se trataron con un 20 % de bloqueante del receptor de Fc (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) para bloquear la unión no específica.

Producción, purificación y conjugación con fluorocromo de anticuerpo monoclonal 1A2. Se conjugó un péptido DC-STAMP sintético correspondiente al cuarto dominio extracelular ⁴⁴⁷Glu-Val-His-Leu-Lys-Leu-His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln⁴⁶⁰ (SEQ ID NO: 1) (número de registro de NCBI Q9H295) con KLH y se inyectó en ratones para la inmunización usando protocolos convencionales (Yokoyama et al., *Curr. Protoc. Immunol.* Capítulo 2, Unidad 2.5 (2006)). Se fusionaron células de bazo de los ratones inmunizados con células tumorales de mieloma para generar un panel de hibridomas. Se recogieron los sobrenadantes de cada hibridoma y se exploró su reactividad anti-DC-STAMP por un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (EIA). Se identificó un anticuerpo monoclonal (mAb) 1A2 con especificidad por DC-STAMP y se usó para todos los experimentos. Se usó el kit de marcaje de proteínas FluorReporter FITC (Molecular Probes; Invitrogen; Carlsbad, CA) para conjugar FITC a 1A2. Los anticuerpos marcados se titularon cuidadosamente y se confirmó su especificidad de unión a DC-STAMP.

Aislamiento celular y enriquecimiento en monocitos. Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre entera por gradiente de Ficoll como se ha descrito previamente (Chiu et al., *Arthritis Res. Ther.* 12:R14 (2010)). Se enriquecieron monocitos humanos de sangre periférica entera por el Cóctel de Enriquecimiento de Monocitos Humanos (StemCell technologies; Vancouver, BC, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tinción celular, clasificación y análisis FACS. Para clasificar células estériles, se resuspendieron PBMC

preparadas en gradiente de Ficoll en PBS estéril (10×10^6 células/ml) y se incubaron con 1A2-FITC durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en PBS (5×10^6 células/ml) y se clasificaron de forma estéril con clasificador FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry Systems; San José, CA). Después de la clasificación, se volvió a examinar la pureza de las células por citometría de flujo y 1×10^5 células se cultivaron en un pocillo de una placa plana de 96 pocillos por triplicado con RANKL y M-CSF durante 8 días. Para el análisis de citometría de flujo, las células se recogieron, se lavaron una vez con PBS, se bloquearon con suero de ratón normal al 5 % durante 10 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con anticuerpo durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células se lavaron minuciosamente con PBS y se fijaron en formaldehído al 2 %. Los datos de FACS se adquirieron usando Canto o LSRII y se analizaron usando el software CellQuest (Becton Dickinson) o FlowJo (TreeStar; Ashland, OR).

Cultivo de OC y tinción TRAP. Se cultivaron PBMC purificadas o monocitos en RPMI (Gibco; Invitrogen; Carlsbad, CA), complementado con suero bovino fetal inactivado térmicamente al 8 % (Hyclone; Thermo Scientific; Logan, UT), glutamina 2 mM, 50 unidades/ml de penicilina y 50 ug/ml de estreptomina. Se añadieron RANKL (100 ng/ml) y CSF (25 ng/ml) al cultivo celular para estimular la generación de OC. Se cultivaron PBMC (1×10^5 células/ml) o monocitos (1×10^6 células/ml) por pocillo en placas de 96 pocillos durante 8 días en una incubadora humidificada a 37 °C con un 5 % de CO₂. Los medios se repusieron cada 2 días. El día 8, las células se fijaron con formaldehído al 3 % y se tiñeron para la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) (Sigma; St. Louis, MO). Las células se examinaron por microscopía óptica y se contaron las células TRAP+ con tres o más núcleos como OC. Para el análisis del efecto inhibidor de 1A2 sobre la formación de OC, 380 mg/ml de 1A2 estaban constantemente presentes en el cultivo celular.

Inmunoprecipitación y análisis de transferencia de western. Se lisaron PBMC humanas purificadas de un gradiente de Ficoll usando el Reactivo de Extracción de Proteína CytoBuster (Novagen; EMD Chemicals; Darmstadt, Germany). Para la inmunoprecipitación, los lisados celulares se sometieron a un ensayo Pull Down por 1A2 anti-DC-STAMP o 3G8 anti-CD16 usando el kit de inmunoprecipitación (Invitrogen). Los inmunoprecipitados se sometieron a un análisis de SDS-PAGE en geles en gradiente de Bis-Tris del 4-12 %, seguido de transferencia en húmedo usando una membrana de PVDF. La membrana primero se sondó con el mAb de fosfotirosina 4G10 (Millipore), el mAb CD16 (BD Biosciences) o el mAb contra DC-STAMP 1A2, seguido de anticuerpo secundario específico de cadena ligera conjugado con HRP. El anticuerpo específico de cadena ligera conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA) se eligió como anticuerpo secundario para evitar la señal de la cadena pesada próxima a 50 kDa. Las manchas de transferencia se revelaron con el kit de sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico o Femto (Pierce; Rockford, IL) y se obtuvieron imágenes en películas científicas Kodak (Eastman Kodak; Rochester, NY).

Tinción de inmunofluorescencia. Los monocitos se enriquecieron por el Cóctel de Enriquecimiento de Monocitos (StemCell) y se cultivaron en portaobjetos de vidrio en medio de cultivo con RANKL y M-CSF durante 8 días. Las células se fijaron en metanol frío a -20 °C durante 10 minutos y se lavaron con PBS. Las células se permeabilizaron y bloquearon con saponina al 0,1 % y BSA/PBS al 0,2 % durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, las células fijas se tiñeron con rodamina faloidina (Molecular Probes), anticuerpo contra DC-STAMP 1A2 conjugado con FITC y DAPI durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de un lavado adicional con saponina al 0,1 % y BSA/PBS al 0,2 % durante 5 minutos. Los portaobjetos se montaron en un 10% de glicerol y un 10 % de Tris 1 M (pH 8). Se tomaron imágenes usando un microscopio de fluorescencia de contraste de fase Zeiss. Para la tinción inmunohistoquímica (Figura 15C), se centrifugaron PBMC y se fijaron en NBF al 10 % (Cardinal Health; Dublin, OH) durante una hora. El sedimento celular se separó suavemente del tubo de centrifuga, se vertió a través de un papel de muestra y se puso en un casete de histología. El casete se procesó en un procesador de tejidos VIP convencional usando un ciclo rutinario corto. El sedimento celular después se incluyó en parafina. Se cortaron secciones en serie de 4 micrómetros y se montaron en portaobjetos de vidrio. La sección de parafina se secó a 60 °C durante una hora y se desparafinizó a través de dos cambios de xileno y alcoholes graduados. Los portaobjetos se habían tratado previamente con Target Retrieval Solutivo, pH 6 (Dato, Carpinteria, CA) durante 20 minutos a 99 °C con un breve periodo de refrigeración y después se lavaron varias veces en Tampón de Lavado 1X nuevo (Dako). Los portaobjetos se incubaron con 1A2 o control de isotipo IgG2a de ratón (BD Biosciences) a diluciones de 1:1500 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos no unidos se retiraron por varios aclarados. La tinción se visualizó por el kit de detección basado en polímero Flex con DAB como cromógeno (Dako) y utilizando como tinte de contraste Flex Hematoxylin (Dako).

Análisis estadístico. El ensayo de permutación se empleó con 10^5 re-muestrajes para el análisis estadístico para evaluar el efecto inhibidor de 1A2 sobre la formación de OC para la Figura 16D(c). La distribución de 4 patrones de DCSTAMP entre HC y PsA se analizó por el análisis exacto de Fisher para la Figura 17(B).

60 RESULTADOS

DC-STAMP es una proteína que lleva ITIM. Recientemente se ha demostrado que la subserie de monocitos inflamatorios CD14+CD16+ se expande preferentemente en pacientes PsA con una afección asociada con una frecuencia de OCP elevada (Chiu et al., Arthritis Res. Ther. 12: R14 (2010). Basándose en este estudio, CD16 puede servir como un marcador de OCP, pero carece de especificidad. Con un papel esencial de DC-STAMP en el

desarrollo de OC, la relación entre la expresión de DC-STAMP y CD16 se examinó para identificar un marcador de OCP adicional que aumentara la especificidad en combinación con CD16. Para este fin, se analizó la expresión en la superficie de DC-STAMP en monocitos CD14+CD16- y CD14+CD16+ con un anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP disponible en el mercado KR1048 (Figura 15A). La intensidad media de fluorescencia (MFI) de DC-STAMP sobre monocitos CD14+CD16+ fue significativamente mayor que la correspondiente a monocitos CD14+CD16- (519 ± 324 vs. 102648, n = 10), lo que sugería una asociación positiva entre la expresión de CD16 y DC-STAMP en monocitos humanos nuevos (Figura 15A).

CD16 lleva un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) sobre el dominio intracitoplásmico (Sandor et al., Immunol. Lett. 54: 123-7 (1996)). La señal de activación mediada por ITAM con frecuencia se acopla a una señal inhibitoria que contrarresta liberada por el receptor que lleva el motivo inhibitorio de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM). Un motivo ITIM es un motivo peptídico corto que contiene una secuencia consenso (I/V/L/S)-XYXX-(L/V) donde X indica cualquier aminoácido (Nimmerjahn y Ravetch, Nat. Rev. Immunol. 8: 34-47 (2008)). Como se muestra en la Figura 15A, se observó una correlación positiva entre la expresión en la superficie de CD16 y DC-STAMP. Este descubrimiento sugirió la posibilidad de que DC-STAMP puede tener un motivo de tipo ITIM capaz de contrarrestar señales inducidas por ITAM sobre CD16. Esta especulación se basó en los cambios dinámicos observados en la expresión de superficie de DC-STAMP y CD16 durante la osteoclastogénesis, en la que la expresión de superficie de CD16 aumentó a lo largo del tiempo, mientras que los niveles de DC-STAMP se redujeron de forma constante (véase más adelante en la Figura 18A). Para explorar esta posibilidad, se exploró la secuencia proteica de DC-STAMP y se identificó un ITIM auténtico, ⁴⁰⁷Ser-Phe-Tyr-Pro-Ser-Val⁴¹² (SEQ ID NO: 4), en el dominio citoplásmico de DC-STAMP.

Se estableció un nuevo anticuerpo monoclonal 1A2 con especificidad anti-DC-STAMP. Actualmente no se dispone de ningún marcador de superficie específico para OCP. Los métodos actuales para la cuantificación de OCP emplean técnicas de cultivo celular, que requieren mucho tiempo, son caras y difíciles de replicar. Además de CD16, recientemente se identificó un posible marcador de superficie de OCP (Chiu et al., Arthritis Res. Ther. 12: R14 (2010)). DC-STAMP se examinó para determinar si DC-STAMP también se expresaba por OCP. Para este fin, como se ha descrito anteriormente, se generó un anticuerpo monoclonal (mAb) contra DC-STAMP. El epítipo (⁴⁴⁷Glu-Val-His-Leu-Lys-Leu-His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln⁴⁶⁰) usado para generar el anticuerpo está muy conservado entre ratones y seres humanos y está localizado en el cuarto dominio extracelular de DC-STAMP. Un clon, 1A2, con reactividad por DC-STAMP se identificó por EIA entre un panel de hibridomas, y la especificidad de 1A2 se confirmó por transferencia de Western con lisados de células murinas. Para determinar si el mAb 1A2 también puede reconocer la proteína DC-STAMP humana, se aislaron los lisados de proteína de monocitos a partir de 2 controles sanos (HC), se separaron por SDS-PAGE y se sondaron por 1A2 en transferencia de western. Como se muestra en la Figura 15B, el mAb 1A2 reconocía una sola banda de 53 kDa específicamente en la transferencia de western. Estos datos demostraron que 1A2 es un nuevo mAb anti-DC-STAMP que reconoce específicamente un epítipo común a la proteína DC-STAMP tanto humana como de ratón.

A continuación, se usó 1A2 para examinar la expresión de DC-STAMP sobre PBMC humanas por tinción inmunohistoquímica (IHC). Una cierta proporción de PBMC se unió por 1A2 (Figura 15C(b)), lo que sugería la expresión de DC-STAMP en esas células. Como DCSTAMP también es central en la formación de células gigantes, se examinó la expresión de DC-STAMP sobre muestras de biopsia recogidas a partir de células gigantes humanas (tumor de hueso). La expresión de DC-STAMP sobre células tumorales de hueso se polarizó como se indica por las flechas mostradas en la Figura 15C(d). La tinción de control con IgG2a de ratón se muestra en las Figuras 15C(a) y 15C(c).

El mAb 1A2 contra DC-STAMP se secuenció de acuerdo con métodos conocidos (Jarrin y Andrieux, Methods Mol. Biol. 96: 21-8 (1999); Eswarakumar et al., Immunogenetics 46: 249-50 (1997); Morrison, Curr. Protoc. Immunol. Capítulo 10, Unidad 10.25 (2001)). La cadena ligera del mAb 1A2 comprende la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 7 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 5. La cadena pesada del mAb 1A2 comprende la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 8 y la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 6.

El mAb 1A2 anti-DC-STAMP bloquea la formación de OC *in vitro*. Previamente se ha mostrado que el anticuerpo policlonal anti-DC-STAMP KR104 inhibía la osteoclastogénesis en células RAW-D y células multinucleadas derivadas de médula ósea (MNC) (Kukita et al., J. Exp. Med. 200: 941-6 (2004)). Se examinó si 1A2 también puede bloquear la formación de OC en PBMC humanas y cultivos de monocitos. 1A2 estaba presente continuamente en cultivos de OC y se reponía después de cada intercambio de medio durante un cultivo de OC de 8 días. De manera interesante, 1A2 bloqueaba la formación de OC eficientemente (Figura 15D(a): sin 1A2; Figura 15D(b): con 1A2). 1A2 bloqueaba la formación de OC de una manera dependiente de la dosificación y era específico para DC-STAMP en comparación con el control de isotipo IgG2a. En presencia de 1A2, la mayoría de los monocitos se detenía en el estadio pre-OC TRAP-positivo (Figura 15D(b)). 1A2 también reprimía la formación de cavidades de resorción en obleas de hueso. El efecto inhibitorio de 1A2 sobre la formación de OC en 6 sujetos se resumió en la Tabla 2. La presencia de 1A2 en cultivo de monocitos inhibía significativamente la formación de OC. Los números medios de OC derivados de 10⁶ monocitos en ausencia o presencia de 1A2 son 489 ± 284 y 61 ± 107, respectivamente (p = 0,013 por ensayo de permutación).

Tabla 2: el mAb contra DC-STAMP 1A2 tenía un efecto inhibitor sobre la formación de OC.

| Sujeto ^a | Sin 1A2 ^b | Con 1A2 ^{b,c} |
|---------------------|----------------------|------------------------|
| A | 125 | 0 |
| B | 740 | 0 |
| C | 500 | 15 |
| D | 155 | 80 |
| E | 745 | 0 |
| F | 670 | 270 |

^aPacientes HC, Ps o PsA
^bnúmeros de OC derivados de 106 células CD14+
^cpresencia constante de 1A2 en el cultivo a la concentración de 380 µg/µl

Los monocitos son la mayoría de las células DC-STAMP+. Se examinó la expresión de DCSTAMP sobre PBMC humanas por 1A2. La expresión de DC-STAMP en PBMC totales, células T y monocitos se muestra en las Figuras 16A, 16B y 16C, respectivamente. Para examinar la expresión de DC-STAMP en PBMC totales, se tiñeron PBMC humanas con un cóctel de anticuerpo compuesto de 1A2-FITC, CD14-APC y 7-AAD. Después de la exclusión de células muertas por 7-AAD (Figura 16A(a)), las PBMC se separaron por selección citométrica en monocitos (los portales P2 y P3 en la Figura 16A(b)) y linfocitos (el portal P1 en la Figura 16A(b)) basándose en el tamaño de las células y la granularidad usando dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC). La expresión de DCSTAMP correspondiente en estas poblaciones de células distintas en relación con el marcador específico de monocitos CD14 se muestra en la Figura 16A(c)-(e) y se superpone en la Figura 16A(f). Se usó el control de tinción de isotipo IgG2a para establecer las líneas de corte entre poblaciones DC-STAMP+ y DC-STAMP- en la Figura 16A(c)-(e). Era evidente que las poblaciones de monocitos (P2 y P3, Figura 16A(d) y e)) eran la mayoría de células que expresaban DC-STAMP, aunque algunas células seleccionadas en la población de linfocitos (P1 en la Figura 16A(b) y (c)) también expresaban DC-STAMP (28,5 % en la Figura 16A (c)). DC-STAMP se expresaba en la superficie de la mayoría de los monocitos (Figura 16A(d)-(e) y 16A(f)). Se observó una mayor intensidad media de fluorescencia (MFI) en los monocitos que sugería que las proteínas DC-STAMP se expresaban a mayores niveles en monocitos que en linfocitos (Figura 16A(f)).

Para superar los retos de la separación entre linfocitos y monocitos únicamente por FSC/SSC (Figura 16A(b)), se incluyeron anticuerpos contra CD3 y CD19 para examinar de forma más precisa la expresión de DC-STAMP en células T y B. El cóctel de anticuerpo estaba compuesto de 1A2 (FITC), CD16 (PE), CD14 (APC), CD3 (Pacific Blue), CD19 (APCCy7) y 7-AAD. Después de la selección con FSC/SSC y de la exclusión de células muertas (Figura 16B(a) y (b)), se seleccionaron individualmente las células CD14+, CD3+ y CD19+ y se analizó la expresión de DCSTAMP en estas tres poblaciones (Figura 16B(c), CD14+: verde; CD3+: azul; CD19+: rojo). Los resultados fueron coherentes con los datos mostrados en la Figura 16A(f), lo que indica que los monocitos son las células DC-STAMP+ principales. De manera interesante, había una pequeña parte de células T CD3+ que expresaba DC-STAMP (indicado por la flecha en la Figura 16B(c)). Se examinó la relación entre la expresión de CD3 y DC-STAMP en PBMC humanas. Como se muestra en la Figura 16B(d), aproximadamente un 12 % de las células T CD3+ totales son DC-STAMP+ (Figura 16B(d)). En todos los experimentos se incluyeron seis controles de tinción de fluorescencia menos uno (FMO-FITC, FMOPE, FMO-APC, FMO-Pacific Blue, FMO-APC-Cy7 y FMO-7AAD). La expresión de DC-STAMP se analizó adicionalmente en las poblaciones de células no T, no B. El panel de tinción de 10 colores incluía anticuerpos contra DC-STAMP, CD14, CD3, CD19, CD11c, CD11b, CD15, CD16, HLA-DR y 7AAD. Se usaron CD14, CD3 y CD19 para identificar monocitos, células T, células B y CD11c, CD11b y HLA-DR para la clasificación de monocitos y macrófagos, respectivamente. La Figura 16C(a)-(d) representa la estrategia de selección por etapas para la selección de la población no T, no B. Primero se seleccionaron PBMC humanas por FSC/SSC (Figura 16C(a)), seguido de exclusión de células muertas usando 7-AAD (Figura 16C(b)), después se seleccionaron células DC-STAMP+ (Figura 16(c)), y se analizaron adicionalmente por los marcadores CD3 y CD19 (Figura 16C(d)). CD19-CD3- (31,9 %, Figura 16C(d), marcado como ∞) y CD19-CD3+ (38,4 %, Figura 16C(d), marcado como *) fueron dos poblaciones de células DC-STAMP+ principales. Como la expresión de DC-STAMP en células CD3+ (Figura 16C(d), marcado por *) ya se habían analizado y mostrado en la Figura 16B, en este caso, los análisis se centraron en la población no T, no B (Figura 16C(d), marcado como ∞). Además, se analizaron adicionalmente células DC-STAMP+CD3-CD19- (∞ en la Figura 16C(d)) en 4 cuadrantes basándose en la expresión de CD14 y CD16 (Figura 16C(e)). Se analizó la expresión de CD11b, CD11c (Figura 16C(e), i, iii, v, vii) y HLA-DR, CD15 (Figura 16C(e), ii, iv, vi, viii) en estos 4 cuadrantes. Las intensidades de expresión de estos marcadores se mostraron por la intensidad media de fluorescencia (MFI) (números en la Figura 16C(e), i a viii). Notablemente, las dos subseries DC-STAMP+CD14+CD16+ (Figura 16C(e), Q2: cuadrante superior derecho) y DC-STAMP+CD14+CD16- (Figura 16C(e), Q3: cuadrante inferior derecho) expresan niveles muy altos de CD11b y CD11c (Figura 16C(e), iii y vii), lo que sugiere que las células CD14+ (Q2 y Q3 en la Figura 16C (e)) eran más homogéneas que las poblaciones de CD16 simple positivo (Q1 en la Figura 16C(e) y CD14-CD16- doble negativo (Q4 en la Figura 16C(e)). Hubo una

mayor expresión de CD11b y CD11c en las células DC-STAMP+CD3-CD19-CD14+ (combinación de Q2 y Q3 en la Figura 16C(e)), lo que sugiere que estas células tienen un mayor potencial de ser precursores de osteoclastos (OC), células dendríticas (DC) y macrófagos.

5 **DC-STAMP tiene el potencial de servir como un marcador de OCP.** Después de examinar una cohorte de sujetos humanos (>100), se identificaron cuatro patrones de expresión de DCSTAMP principales en PBMC humanas y se denominaron patrones I a IV (Figura 17A). El patrón I tenía el menor número de células DC-STAMP+, mientras que el patrón IV tenía el mayor número de células DC-STAMP+. La Tabla 3 indica los criterios para la clasificación de estos patrones basándose en la relación de células DC-STAMP+ con respecto a DC-STAMP-. La relación de DC-
 10 STAMP+ con respecto a DC-STAMP- se multiplicó por 100 y se usó como criterio para clasificar patrones. En resumen, el número para el patrón I era <20, para el patrón II era >20 pero <67, para el patrón III era > 68 pero <240 y, para el patrón IV, era mayor de 240, respectivamente. Para determinar si DC-STAMP podía usarse como biomarcador de OCP, se examinó la correlación entre estos cuatro patrones de expresión de DC-STAMP y la frecuencia de OCP. El patrón de expresión de DC-STAMP se examinó en PBMC aisladas recientemente por
 15 citometría de flujo y la enumeración de OC se realizó el día 8 por tinción con TRAP. El cultivo de OC se estableció en PBMC aisladas de once sujetos HC y veintinueve sujetos PsA. Curiosamente, los pacientes HC y PsA mostraron una distribución desigual en los patrones de DC-STAMP (Figura 17B). Once sujetos HC demostraron el patrón I de expresión de DC-STAMP, mientras que los pacientes PsA se distribuyeron en todos los patrones con 4, 6, 5, 6 sujetos en el patrón I, II, III, IV, respectivamente (Figura 17B). La distribución de sujetos HC y PsA dentro de estos
 20 cuatro patrones de DCSTAMP se examinó por el análisis exacto de Fisher. Los resultados indicaron que había una diferencia significativa en la distribución de HC y PsA dentro de estos patrones ($p = 0,011$). Los números medios de OC derivados del patrón I, II, III y IV de DC-STAMP fueron 50, 98, 105 y 203, respectivamente (Tabla 4 y Figura 17B). Estos resultados sugerían que existe una correlación entre la frecuencia de OCP y los patrones de DC-STAMP, dado que la frecuencia de OC aumentaba según se desplazaba el patrón de DC-STAMP desde el patrón I
 25 hacia el IV.

Tabla 3: clasificación de cuatro patrones principales de DC-STAMP en PBMC humanas.

| Patrón de DC-STAMP | Relación DC-STAMP+/-* | n.º de sujetos HC | n.º de sujetos PsA |
|--------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| I | 1 a 20 | 11 | 4 |
| II | 20 a 67 | 0 | 6 |
| III | 68 a 240 | 0 | 5 |
| IV | >240 | 0 | 6 |

*El porcentaje de células DC-STAMP+ en PBMC humanas totales se divide por el de células DC-STAMP-

30

Tabla 4: análisis estadístico de la relación entre los patrones de expresión de DC-STAMP y el recuento de OC.

| Patrón de DC-STAMP | Mediana de OC | Intervalo de confianza del 95 % de mediana de OC | Rango intercuartílico de OC |
|--------------------|---------------|--|-----------------------------|
| I | 50 | 15-105 | 17-105 |
| II | 98 | 13-385 | 21-390 |
| III | 105 | 30-131 | 62-131 |
| IV | 203 | 10-491 | 35-340 |

35 **Los monocitos humanos regulaban negativamente DC-STAMP durante la osteoclastogénesis.** Está bien establecido que DC-STAMP está implicado en la fusión celular de monocitos murinos, pero la variación de la expresión en la superficie durante el transcurso de la osteoclastogénesis en monocitos humanos no se ha caracterizado. Se examinó la alteración de la expresión en la superficie celular de DC-STAMP en monocitos humanos cultivados en medios pro-osteoclastogénicos para comprender mejor la secuencia temporal de expresión de DC-STAMP durante la osteoclastogénesis (Figura 18A). Los monocitos humanos enriquecidos expresaban un
 40 alto nivel de DC-STAMP en la superficie (Figura 18A-a). La expresión en la superficie de DC-STAMP estaba regulada negativamente después de 1 día de exposición a RANKL+M-CSF (Figura 18A-b) y continuaba reduciéndose después del día 2 (Figura 18A, c-e). Notablemente, la expresión en la superficie de DC-STAMP se reducía espectacularmente después del día 6 y se volvía indetectable después del día 7 (Figura 18A-e), un punto de tiempo en el que los OC maduros se visualizaban por tinción con TRAP.

45

A continuación, se examinó la localización celular de DC-STAMP sobre OC. En contraste con varios estudios en los que se realizó la localización de DC-STAMP sobre DC en células transfectadas con una proteína de fusión DC-STAMP-GFP (Sawtani et al., Int. Immunol. 20: 1259-68 (2008); Eleveld-Trancikova et al., J. Leukoc. Biol. 77: 337-43 (2005); Jansen et al., 46: 505-15 (2009)), se usó el mAb anti-DC-STAMP 1A2 establecido recientemente para
 50 localizar la proteína DC-STAMP endógena. Este enfoque es un método más fiable para rastrear la localización de la proteína que la colocación de marcadores de GFP (Lisenbee et al., Traffic 4: 491-501 (2003)). Después de 8 días de

cultivo con RANKL+M-CSF, la mayoría de los monocitos no podían diferenciarse en OC y manifestaban una morfología con forma de huso (Figura 18B(a)), indicativa de un estadio de diferenciación de pre-osteoclasto. La proteína DC-STAMP se localizaba intracelularmente con una distribución puntuada en estas células (Figura 18B(a)). Por el contrario, la proteína DC-STAMP no podía identificarse en OC multinucleados de los mismos cultivos (Figura 5 18B(b)). Estos policariones que carecían de proteína DC-STAMP presentaban anillos de actina prominentes, una estructura asociada con la capacidad de resorción ósea de OC. Considerados conjuntamente, los datos de tinción con FACS (Figura 18A) y confocales (Figura 18B) sugieren que DC-STAMP se regula negativamente cuando los monocitos se diferencian en OC.

- 10 **Los monocitos DC-STAMP^{high} generan más osteoclastos que los monocitos DC-STAMP^{low}.** Para determinar si el nivel de expresión en la superficie de DC-STAMP sobre monocitos se correlaciona con la capacidad de estas células de experimentar osteoclastogénesis, se tiñeron monocitos humanos recién aislados y enriquecidos (>85 % de pureza) con el mAb contra DC-STAMP 1A2 y las células se clasificaron en dos poblaciones, DC-STAMP^{high} y DC-STAMP^{low} (Figura 19A, 1,9 % máximo y 1,8 % mínimo de monocitos clasificados totales, respectivamente). Las actividades de resorción ósea de estas dos poblaciones se evaluaron después de cultivar las células durante 8 días con RANKL y M-CSF.

Como se muestra en la Figura 19B, se generaron más OC maduros TRAP+ a partir de DC-STAMP^{high} recién aislados (162 por 10⁵) en comparación con células DC-STAMP^{low} (2 por 10⁵). Además, las actividades de resorción 20 ósea de estas dos poblaciones celulares se examinaron con el ensayo de oblea de hueso (Figura 19B(c) y (d)). Más del 90 % de la superficie del hueso se erosionó profundamente por OC derivados de monocitos humanos DC-STAMP^{high} recientemente aislados (Figura 19B(d)), mientras que las células derivadas de monocitos humanos DC-STAMP^{low} recientemente aisladas producían menos cavidades de erosión superficiales comparativamente (<10 %, Figura 19B(c)). Considerados conjuntamente, los resultados sugieren una asociación positiva entre la 25 expresión de DC-STAMP, el potencial osteoclastogénico y la actividad de resorción ósea en monocitos humanos.

DC-STAMP se fosforila en sus restos de tirosina e interacciona con SHP-1. Con el conocimiento de que DC-STAMP contiene un motivo ITIM, se examinó adicionalmente la fosforilación de DC-STAMP a nivel de la proteína. La presencia de un resto de tirosina (⁴⁰⁷Ser-Phe-Tyr-Pro-Ser-Val⁴¹²) (SEQ ID NO: 4) en el ITIM de DC-STAMP, sugería 30 un posible sitio de fosforilación. De esta manera, se examinaron los perfiles de fosforilación de tirosina de DC-STAMP por análisis de transferencia de Western en monocitos que se cultivaron en presencia de M-CSF y RANKL o IL-4 y GM-CSF (Figura 20A). Como los pesos moleculares (M.W.) de DC-STAMP y la cadena pesada (50 kDa) están muy próximos, se usó el segundo anticuerpo específico de cadena ligera para evitar el efecto de fondo de la cadena pesada en las transferencias de Western. Se sometieron lisados celulares de OC, DC y monocitos a 35 inmunoprecipitación con mAb contra DC-STAMP 1A2. Los inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE y después se sometieron a inmunotransferencia con anti-fosfotirosina 4G10 (Figura 20A(a)). En los 3 linajes celulares se detectó una banda predominante de 54 kDa correspondiente al peso molecular de DC-STAMP. Además de esta banda, había una banda extra (~ 83 kDa) que puede ser una isoforma de DC-STAMP con una modificación postraduccional tal como glicosilación. A continuación, se inmunoprecipitaron lisados celulares de OC con mAb anti-DC-STAMP o anti-CD16 y la mancha de transferencia se sondó con 1A2 anti-DC-STAMP. Como se muestra en la 40 Figura 24B, el mAb contra CD16 podía reducir el nivel de proteína DC-STAMP, lo cual indica una interacción física entre CD16 y DC-STAMP. Se inmunoprecipitaron menos proteínas DC-STAMP por el mAb contra CD16 que por el mAb contra DC-STAMP (compárense las Figuras 20B(a) y (b)).

45 A continuación, se inmunoprecipitaron los mismos lisados celulares a partir de OC, DC y monocitos con el mAb contra CD16 y después se sometieron a inmunotransferencia con 4G10 antifosfotirosina (Figura 20A(b)). A diferencia de los lisados celulares de OC y monocitos (Figura 24A(b), 1^a y 3^a calles) con la única banda de 54 kDa correspondiente a la proteína DC-STAMP, se atenúa la intensidad de la banda de 54 kDa en los lisados de DC. En su lugar, había una banda de mayor tamaño adicional (~ 70 kDa) en los lisados de DC que no se observaba en 50 OC o monocitos. La cantidad de fosforilación de DC-STAMP coimmunoprecipitada con CD16 era comparable entre los OC y los monocitos (Figura 20A(b), 1^a y 3^a calles). Los datos sugirieron que DC-STAMP demostraba un menor grado de fosforilación en DC. LILRB y PIR-B, los otros dos receptores de tipo inmunoglobulina que llevaban ITIM, se sabe que reclutan la fosfatasa SHP-1 y suprimen el desarrollo de OC *in vitro*. Estas son características comunes para los receptores de tipo Ig con funciones inhibitorias. De esta manera, se examinó si DC-STAMP, de forma 55 similar a sus moléculas que llevan ITIM, también señala mediante una interacción con SHP-1 como se observa en LILRB y PIR-B. Los lisados celulares primero se inmunoprecipitaron por el mAb 1A2 anti-DC-STAMP y se sometieron a inmunotransferencia con el mAb anti-SHP-1. Se observó una sola banda de 70 kDa correspondiente a SHP-1 en estos inmunoprecipitados (Figura 20C), lo que sugiere una interacción entre DC-STAMP y SHP-1. De manera interesante, estaban presentes dos bandas (~ 70 kDa y ~ 68 kDa) en el control positivo (Figura 20C(a), IP 60 con SHP-1 e IB con SHP-1).

Ejemplo 3: caracterización farmacocinética del mAb 1A2 contra DC-STAMP. Para determinar las propiedades farmacocinéticas del mAb 1A2 contra DC-STAMP, se proporcionó una sola administración subcutánea de 30 mg/kg a ratones BALB/c. Cuatro ratones se dosificaron con el mAb 1A2 y se recogieron muestras de sangre seriadas a 65 partir de la vena de la cola 1, 4, 7, 24, 48, 72, 103 y 168 horas después. Se determinó que la media de la

concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) era de 305 mg/ml, lo que era de esperar después de una dosis de 30 mg/kg. El tiempo transcurrido para conseguir la $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$) fue relativamente corto, indicando que la absorción de este anticuerpo después de la dosificación subcutánea no era un problema. El ratón 1 se retiró después de 72 horas debido a la pérdida de peso, de forma que no se realizó el análisis PK en el ratón 1. En las Tablas 5 y 6 presentadas a 5 continuación se muestra un resumen de los resultados.

Tabla 5: farmacocinética en suero subcutánea de 1A2.

| Ratón ID | Ratón 2 | Ratón 3 | Ratón 4 | Media | SE |
|----------------------------|---------|---------|---------|--------|------|
| $C_{m\acute{a}x}$ (µg/ml) | 341 | 256 | 317 | 305 | 25 |
| $T_{m\acute{a}x}$ (h) | 48 | 24 | 24 | 32 | 8 |
| $AUC_{(last)}$ (h · mg/ml) | 44542 | 33562 | 39977 | 40027 | 2593 |
| $AUC_{(inf)}$ (h · mg/ml) | 122893 | 96428 | 128894 | 116072 | 9973 |
| % Extrapolación | 63,8 | 63,1 | 69 | 65,3 | 1,9 |
| CL/F_{sc} (ml/h/kg) | 0,24 | 0,31 | 0,23 | 0,26 | 0,02 |
| MRT_{inf} (h) | 350 | 366 | 425 | 380 | 23 |
| $T_{1/2}$ (h) | 231,9 | 253,4 | 285,9 | 257 | 15,7 |

$C_{m\acute{a}x}$: concentración máxima; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo transcurrido para alcanzar la concentración máxima; $AUC_{(last)}$: área bajo la curva de concentración hasta la última medición validada; $AUC_{(inf)}$: área bajo la curva de concentración hasta el infinito; CL/F_{sc} : aclaramiento sistémico; MRT_{inf} : tiempo medio de residencia al infinito; $T_{1/2}$: semivida; h: hora; h · mg/ml: hora · miligramo por mililitro; ml/h/kg: mililitro por hora por kilogramo.

10

Tabla 6: datos en suero

| Tiempo (h) | Concentración (µg/ml) | | | | | |
|------------|-----------------------|---------|---------|---------|-------|------|
| | Ratón 1 | Ratón 2 | Ratón 3 | Ratón 4 | Media | SD |
| 1 | 26,4 | 33,3 | 38,1 | 33,1 | 32,7 | 4,8 |
| 4 | 154,3 | 209,7 | 217,4 | 178,3 | 189,9 | 29,1 |
| 7 | 218,9 | 224,1 | 238,6 | 232,9 | 228,6 | 8,8 |
| 24 | 273,8 | 299,5 | 255,6 | 317,4 | 286,6 | 27,3 |
| 48 | N/S | 341,1 | 242,6 | 295,8 | 293,2 | 49,3 |
| 72 | 231,5 | 292,1 | 233,7 | 247,3 | 251,1 | 28,2 |
| 103 | N/S | 242,4 | 198,9 | 200,7 | 214,0 | 24,6 |
| 168 | N/S | 234,2 | 166,5 | 215,6 | 205,4 | 35,0 |

N/S: sin muestra

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> University of Rochester
- <120> Anticuerpos anti-DC-STAMP
- <130> 20724-0037WO1
- 20 <150> US 61/174.219
- <151> 30-04-2009
- <160> 8
- 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 4
- <210> 1
- <211> 14
- 30 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial


```

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1          5          10          15
Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro
          20          25          30
Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
          35          40          45
Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
          50          55          60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala
65          70          75          80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          85          90          95
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
          100          105          110
Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
          115          120          125
Leu Glu Ile Lys Arg Thr
          130

```

5 <210> 6
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400>6

```

Met Gly Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Thr Val Pro Ala Tyr
1          5          10          15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
          20          25          30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
          35          40          45
Ser Thr Phe Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
          50          55          60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65          70          75          80
Ser Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
          85          90          95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
          100          105          110
Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Ile Gly Ser Arg Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
          115          120          125
Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          130          135

```

15 <210> 7
 <211> 402
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 7

ES 2 635 727 T3

```

atgaggttct ctgctcagct tctggggctg cttgtgctct ggatccctgg atccactgca 60
gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc 120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg 180
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag gtcctgattt atcagatgtc caaccttgcc 240
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg 360
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa ataaaacgta cg 402

```

<210> 8

<211> 414

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 8

```

atgggcagac ttacattctc attcctgtta ctgactgtcc ctgcatatgt cctgtcccag 60
gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 120
tgttctttct ctgggttttc actgagcact tttggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag 180
ccttcagga agggctctgga gtggctggca cacatttggg gggatgatga taagtactat 240
agtccagccc tgaagagtcg gctcacaatc tccaaggata cctccaaaaa ccaggatttc 300
ctcaagatcg ccaatgtgga cactgcagat actgccacat actattgtgt tcgaatagga 360
tcacgggtccc cttttgctta ctggggccca ggaactctgg tcacagtctc gagt 414

```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo de DC-STAMP, en donde el epítipo es Glu-Val-His-Leu-Lys-Leu-His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln (SEQ ID NO: 1), en donde una cadena ligera del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 5, y en donde una cadena pesada del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 6.
2. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un epítipo de DC-STAMP, en donde el epítipo es His-Gly-Glu-Lys-Gln-Gly-Thr-Gln (SEQ ID NO:2), en donde una cadena ligera del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 5, y en donde una cadena pesada del anticuerpo monoclonal comprende la SEQ ID NO: 6.
3. Una composición que comprende un anticuerpo, en donde la composición comprende un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de DC-STAMP de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2.
4. La composición de la reivindicación 3, en donde la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, para uso en la inhibición de la osteoclastogénesis en una célula.
6. Un método para inhibir la osteoclastogénesis en una célula, comprendiendo el método administrar *in vitro* a la célula la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4.
7. La composición para uso de la reivindicación 5 o el método de la reivindicación 6, en donde la célula es una célula de mamífero.
8. La composición para uso o el método de la reivindicación 7, en donde la célula de mamífero es una célula humana.
9. La composición para uso de la reivindicación 5 o el método de la reivindicación 6, en donde la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

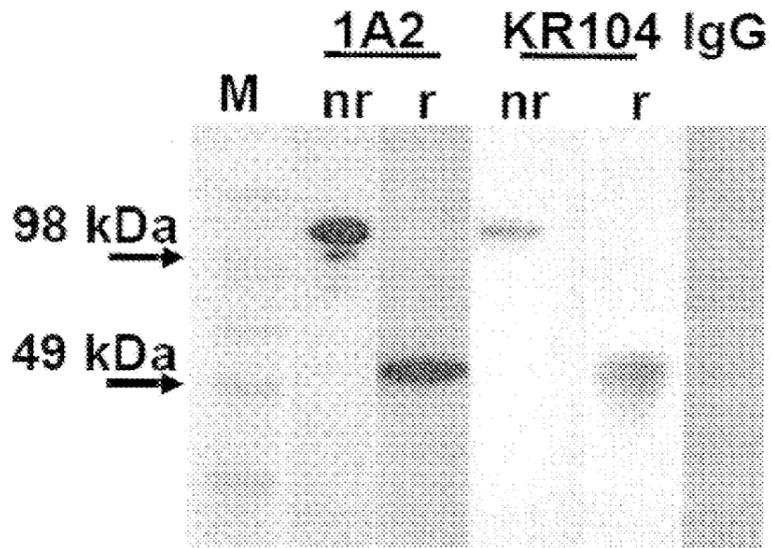


Figura 1A

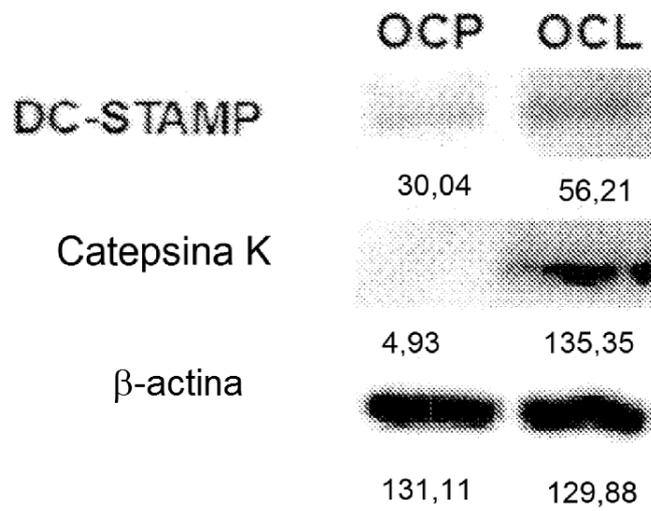


Figura 1B

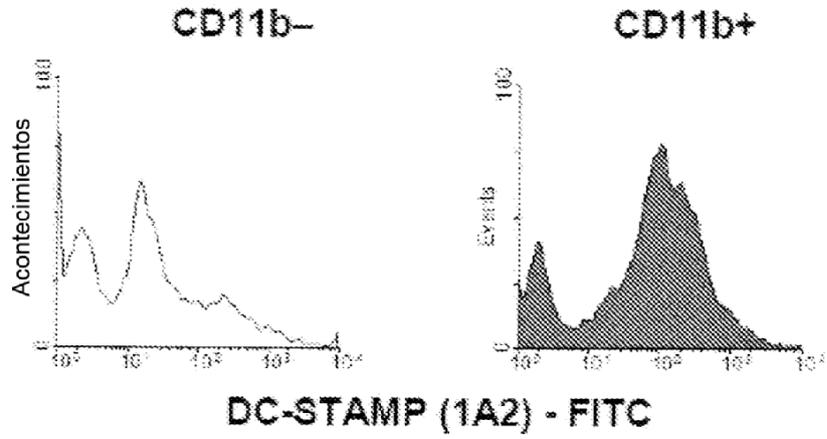


Figura 2A

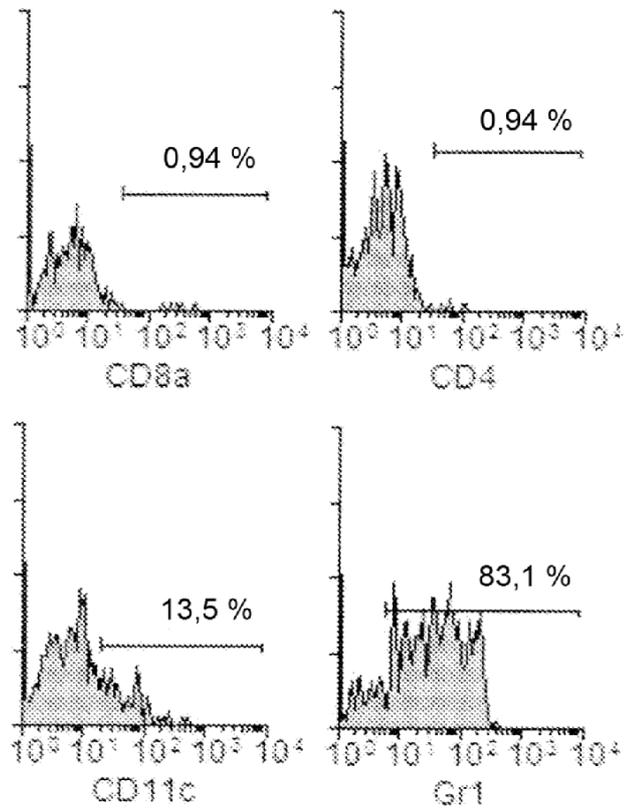


Figura 2B

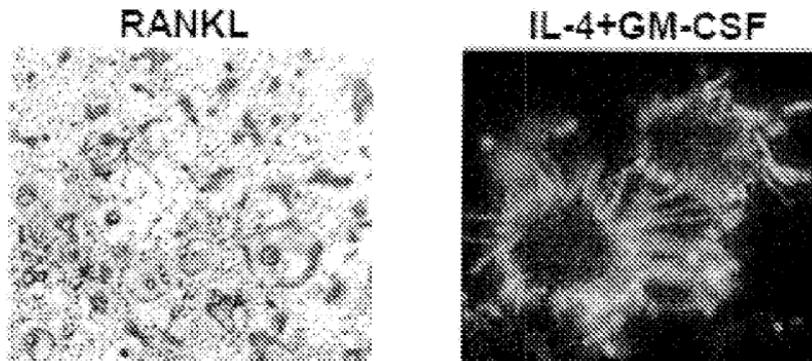


Figura 3A

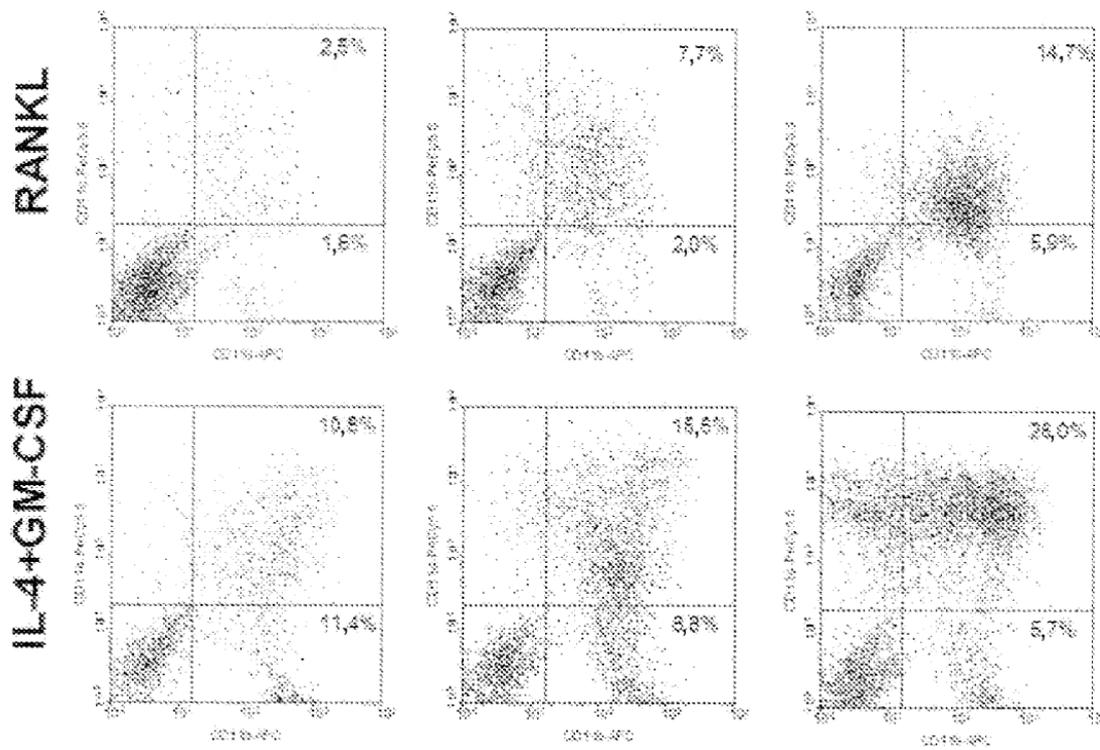


Figura 3B

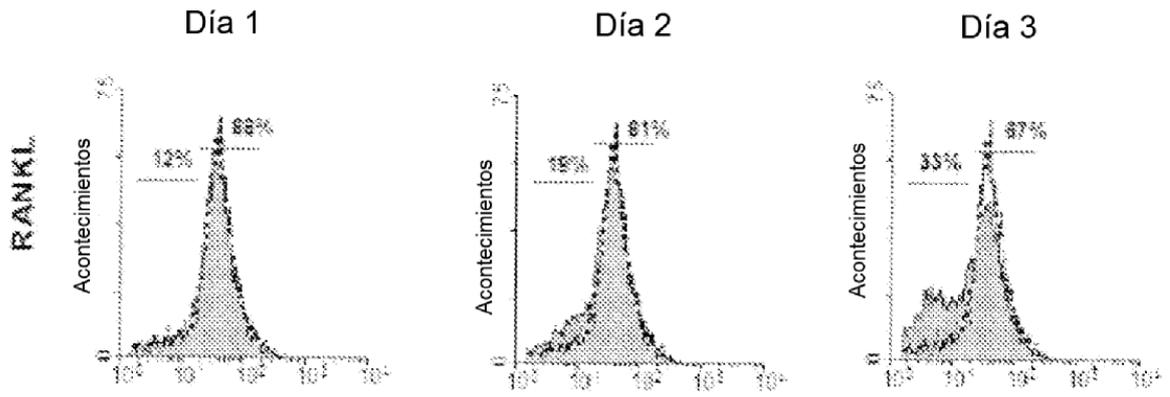


Figura 4A

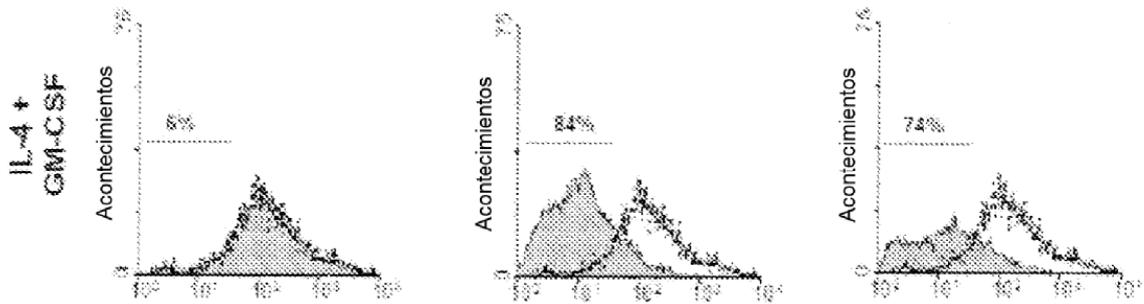


Figura 4B

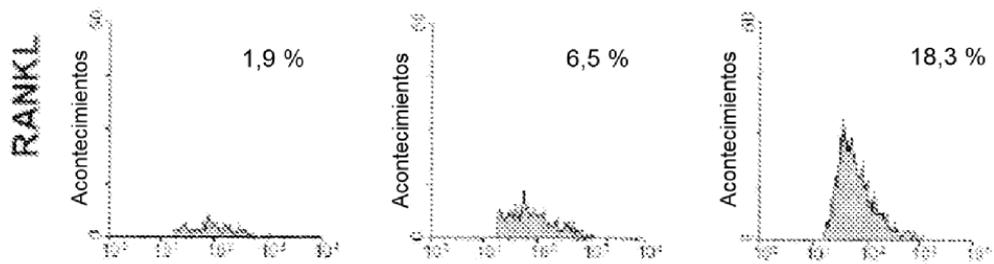


Figura 4C

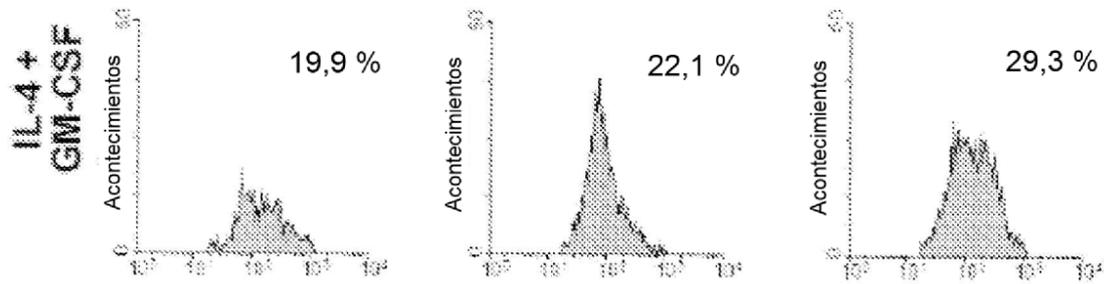


Figura 4D

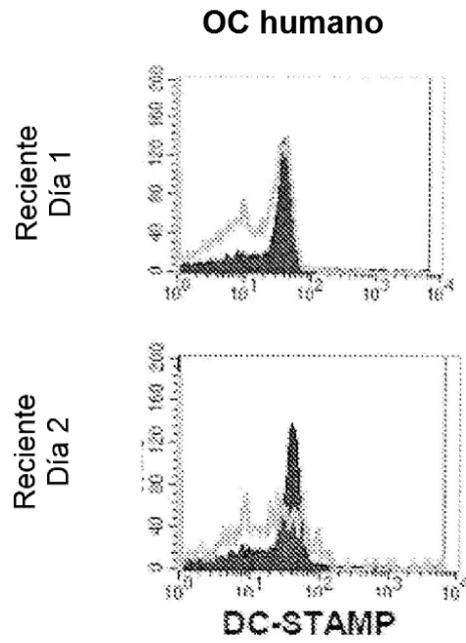


Figura 5A

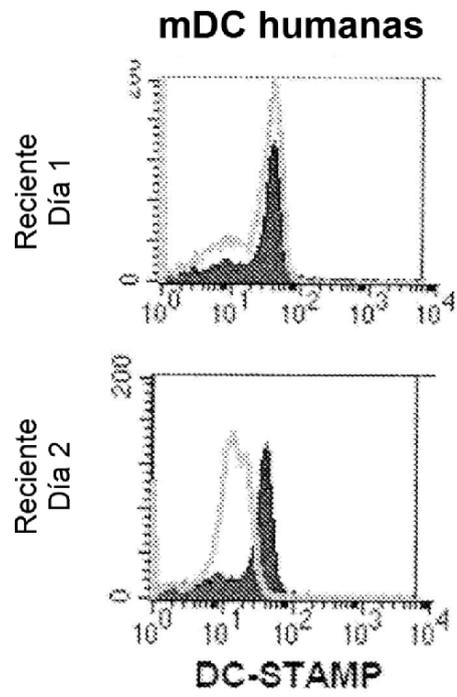


Figura 5B

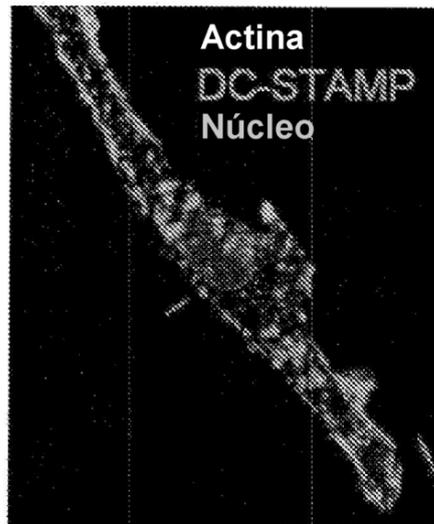


Figura 5C



Figura 5D

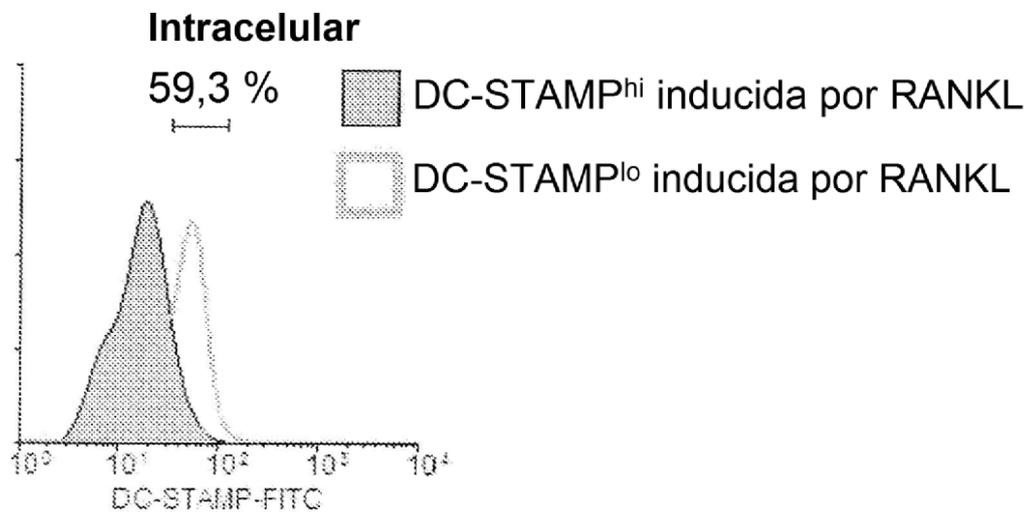


Figura 6A

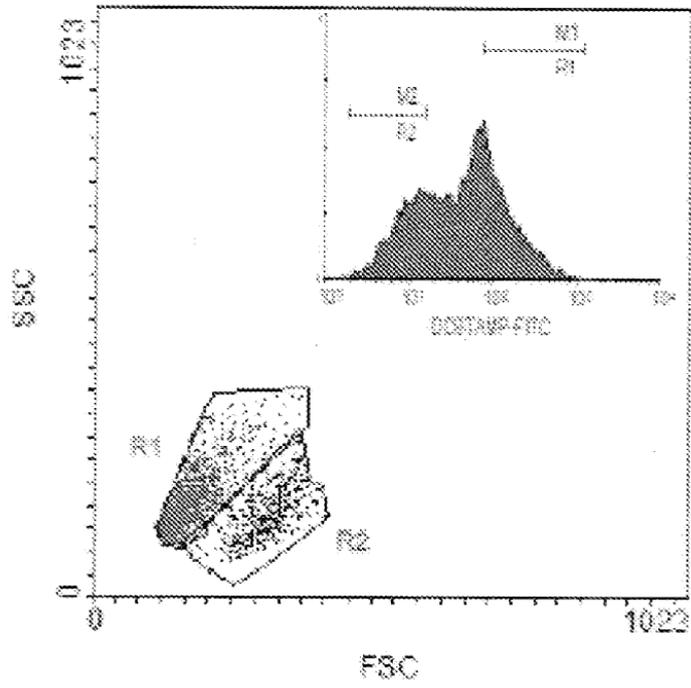


Figura 6B

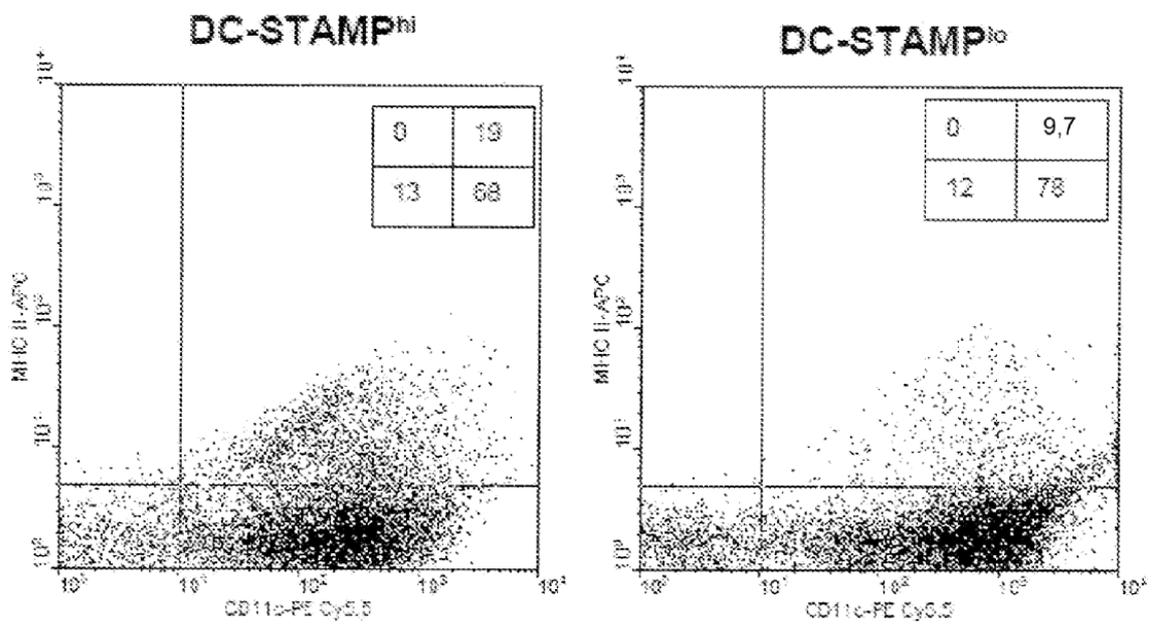


Figura 6C

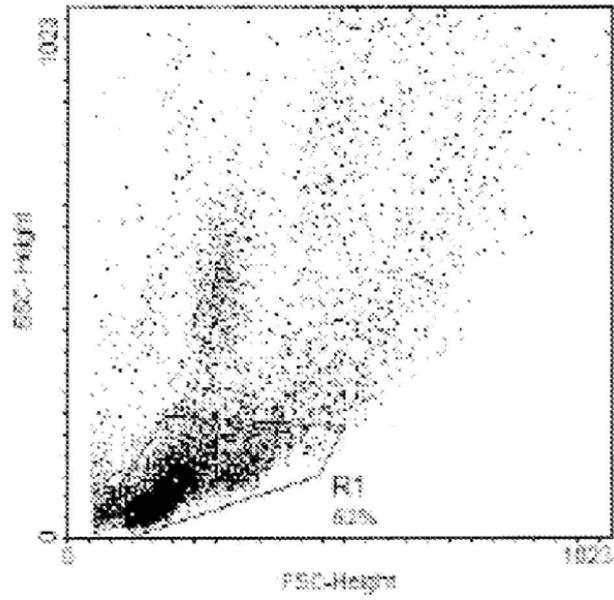


Figura 7A

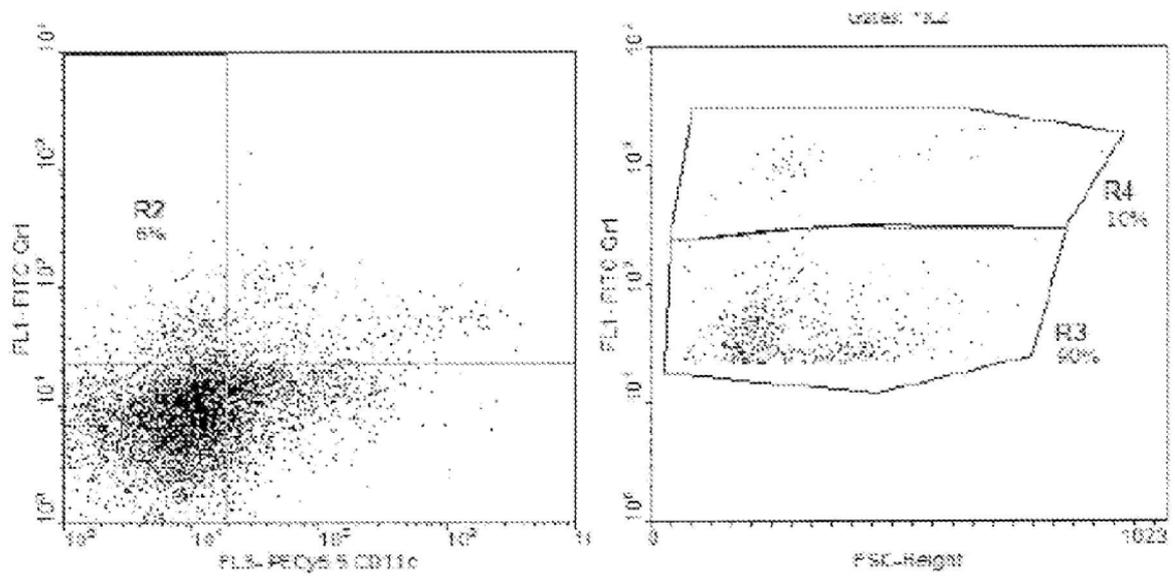


Figura 7B

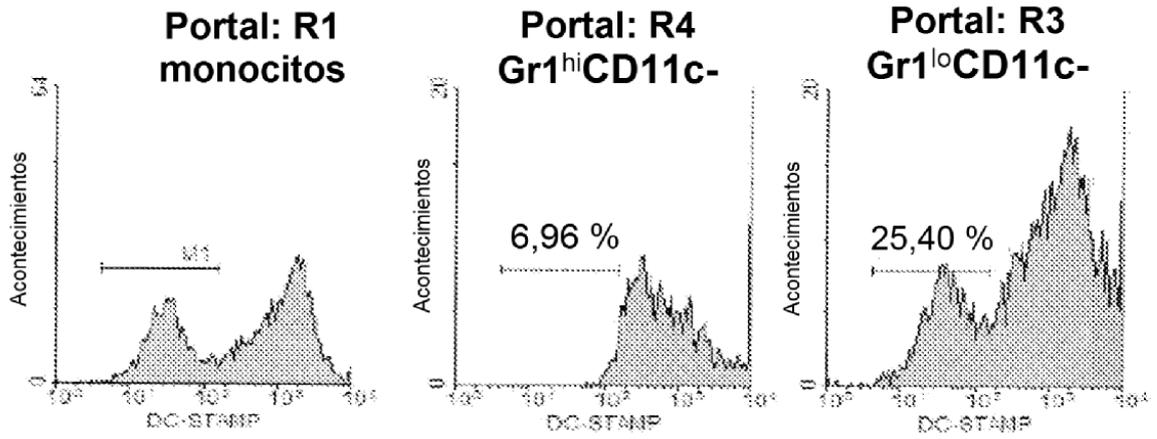


Figura 7C

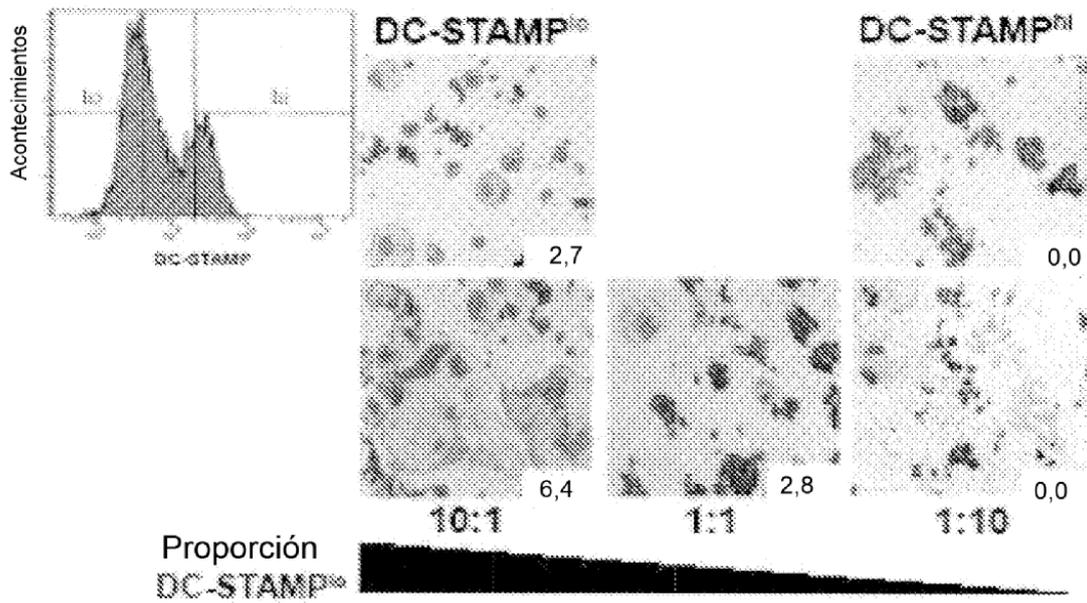


Figura 8A

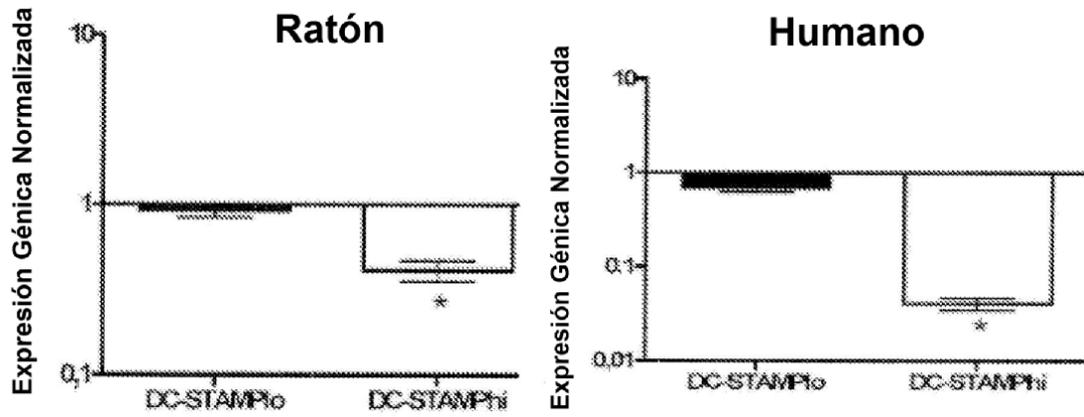


Figura 8B

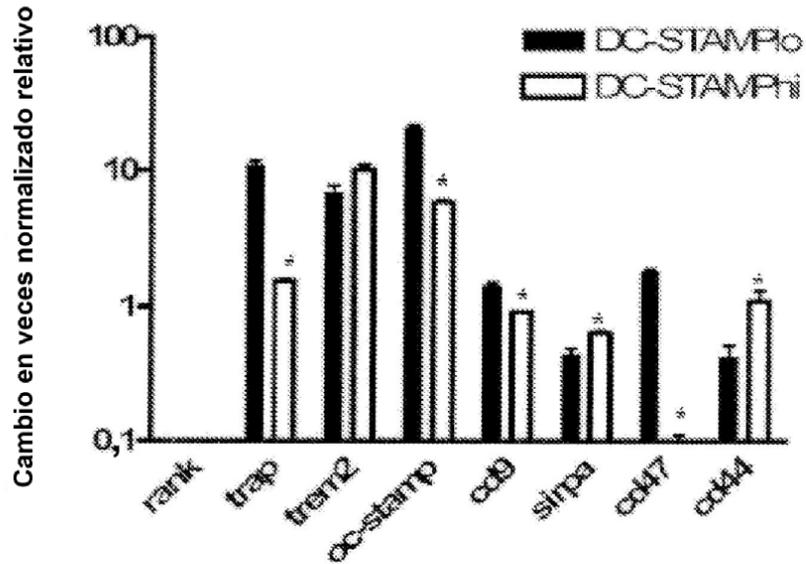


Figura 8C

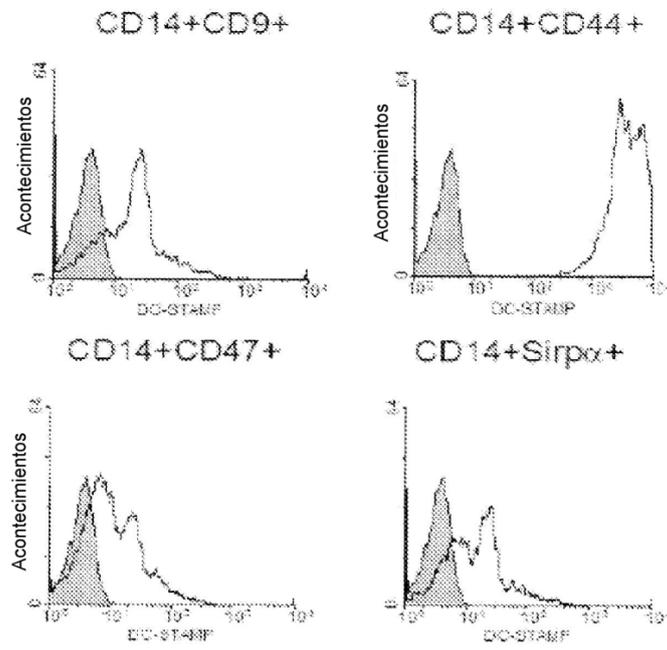


Figura 9A

| Gen | DC-STAMP ^{lo} | DC-STAMP ^{hi} |
|--------------|------------------------|------------------------|
| <i>trap</i> | 1,41 | 0,67 |
| <i>cd9</i> | 0,60 | 0,48 |
| <i>cd44</i> | 1,38 | 0,60 |
| <i>cd47</i> | 0,05 | 2,97 |
| <i>sirpα</i> | 17,73 | 4,90 |

Figura 9B

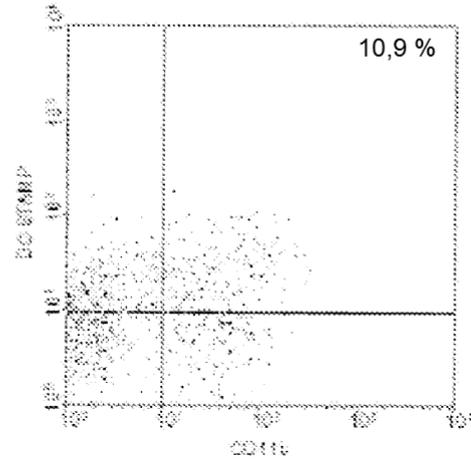
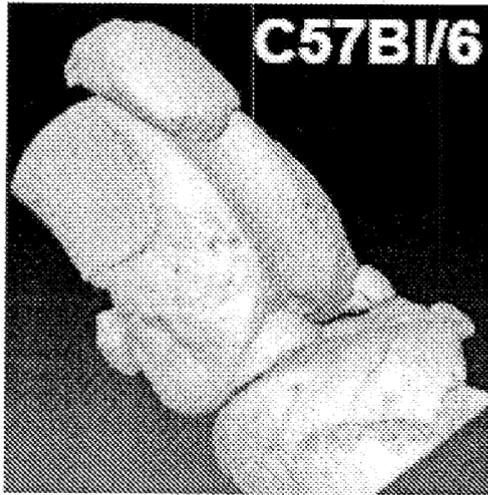


Figura 10A

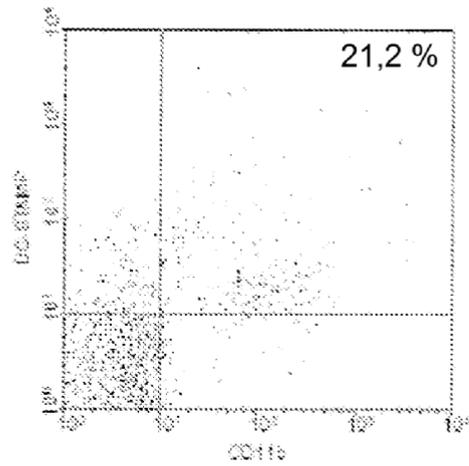
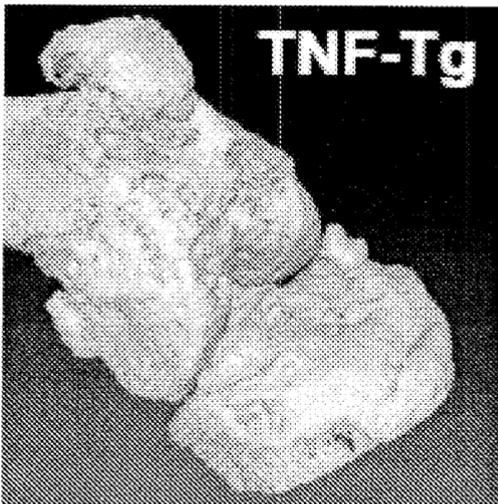


Figura 10B

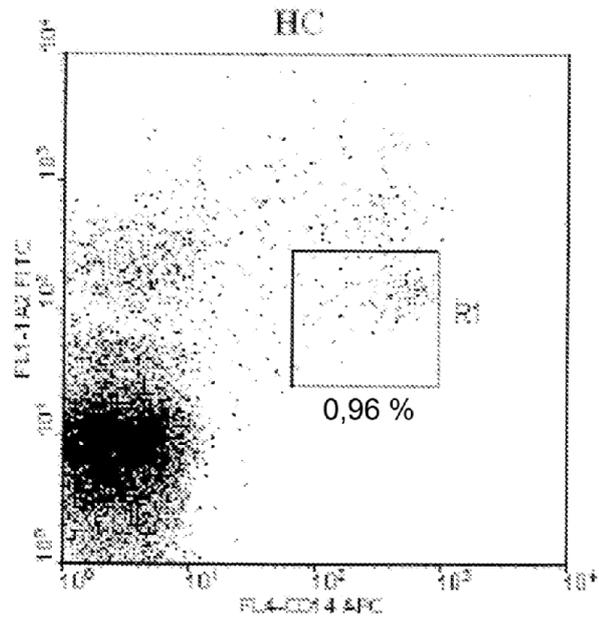


Figura 10C

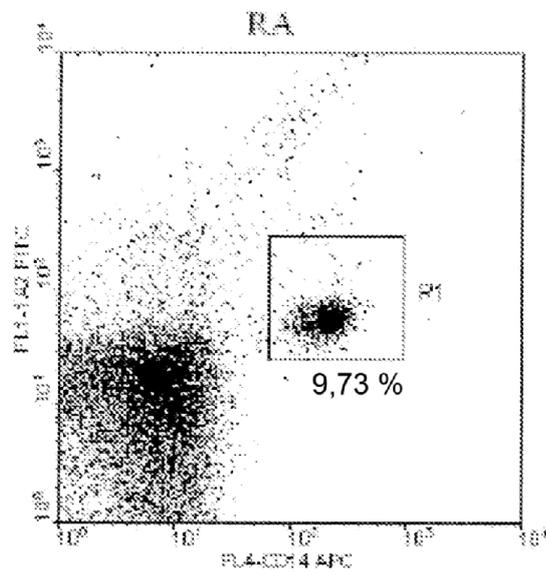


Figura 10D

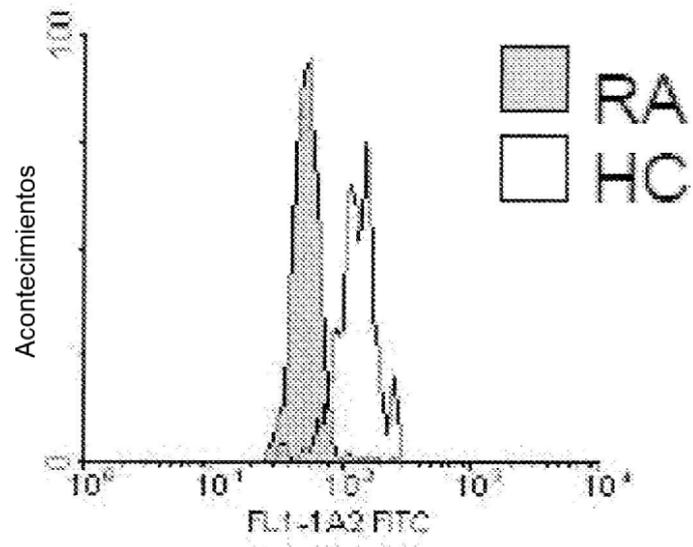


Figura 10E

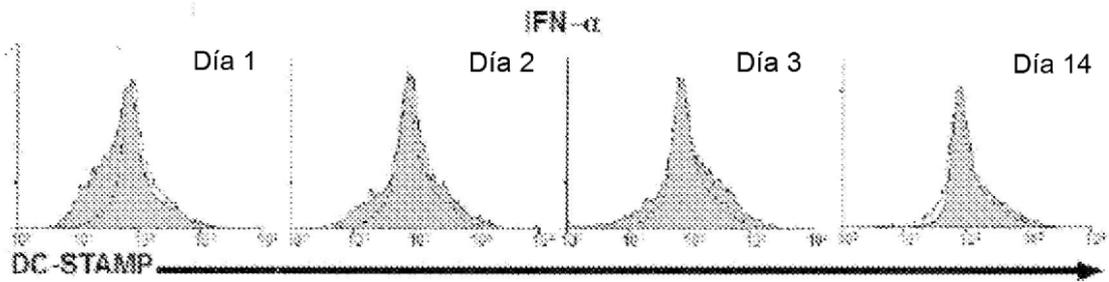


Figura 11A

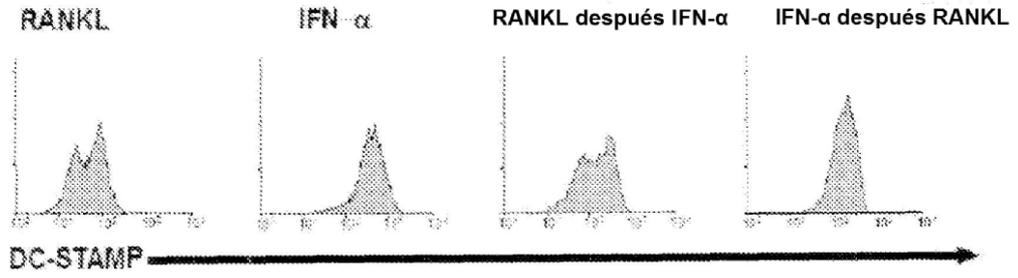


Figura 11B

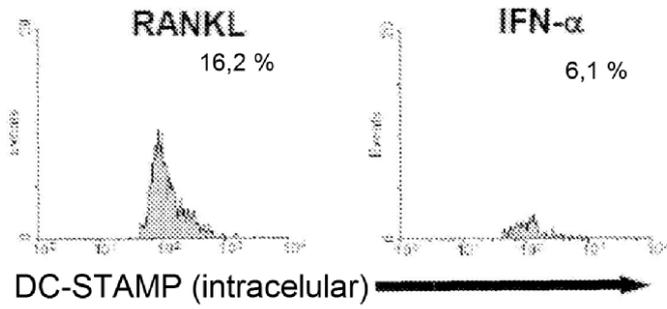


Figura 11C

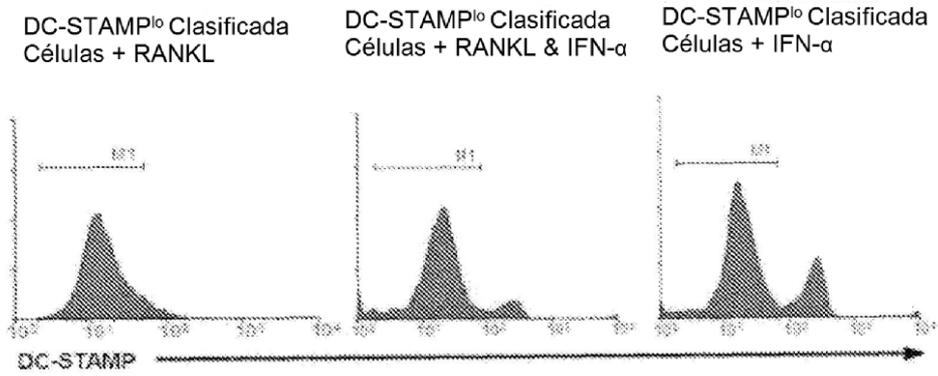


Figura 11D

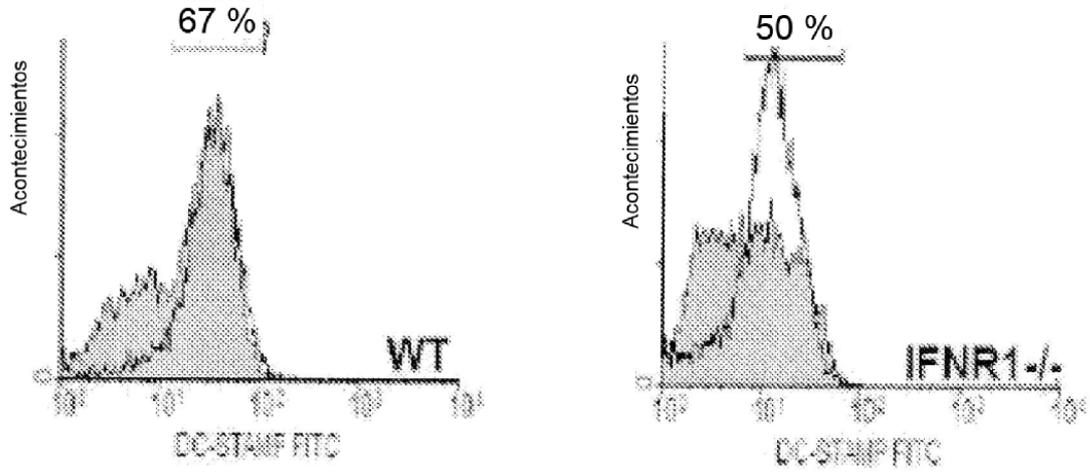


Figura 11E

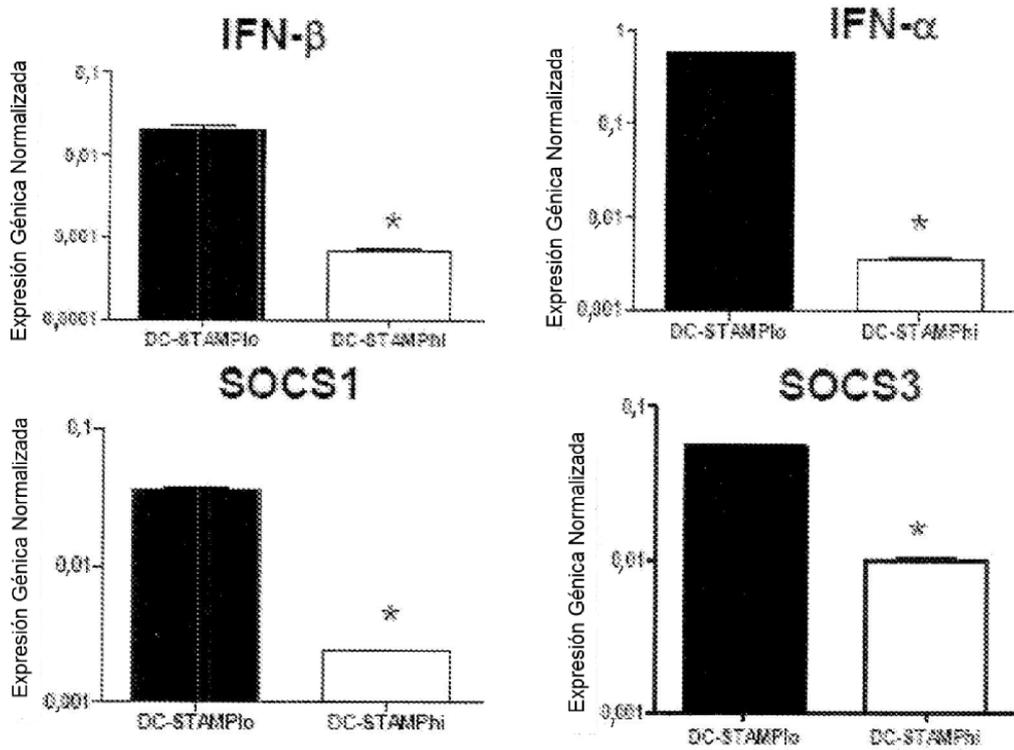


Figura 12A

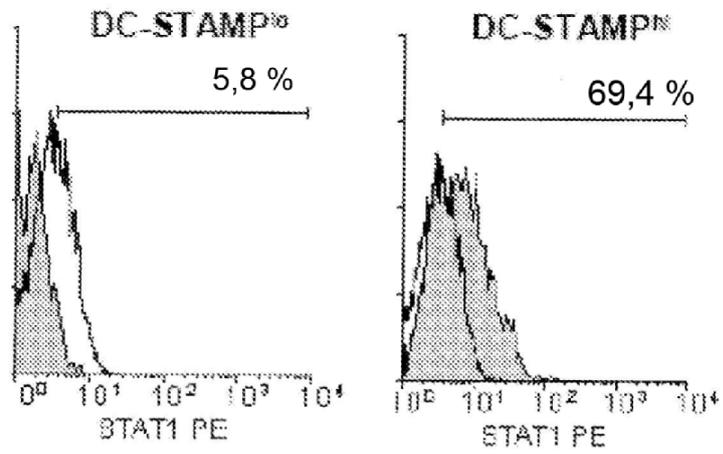


Figura 12B

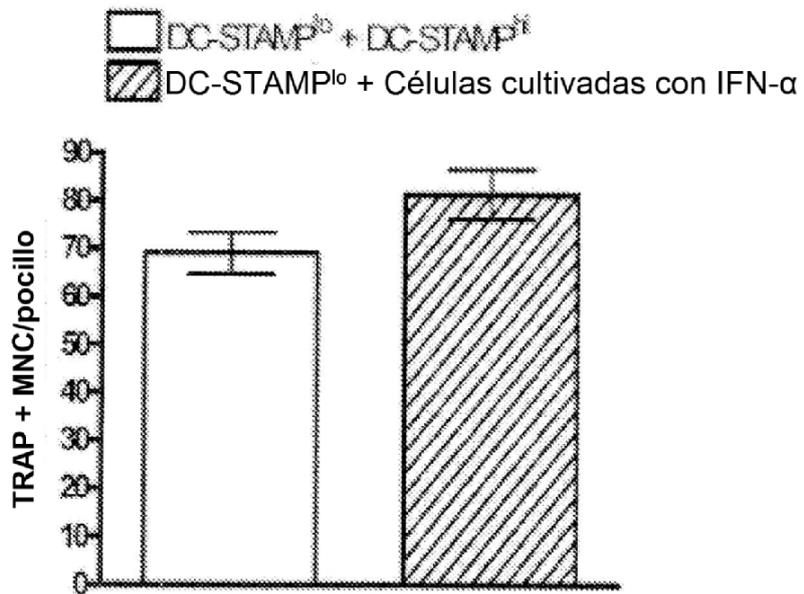


Figura 12C

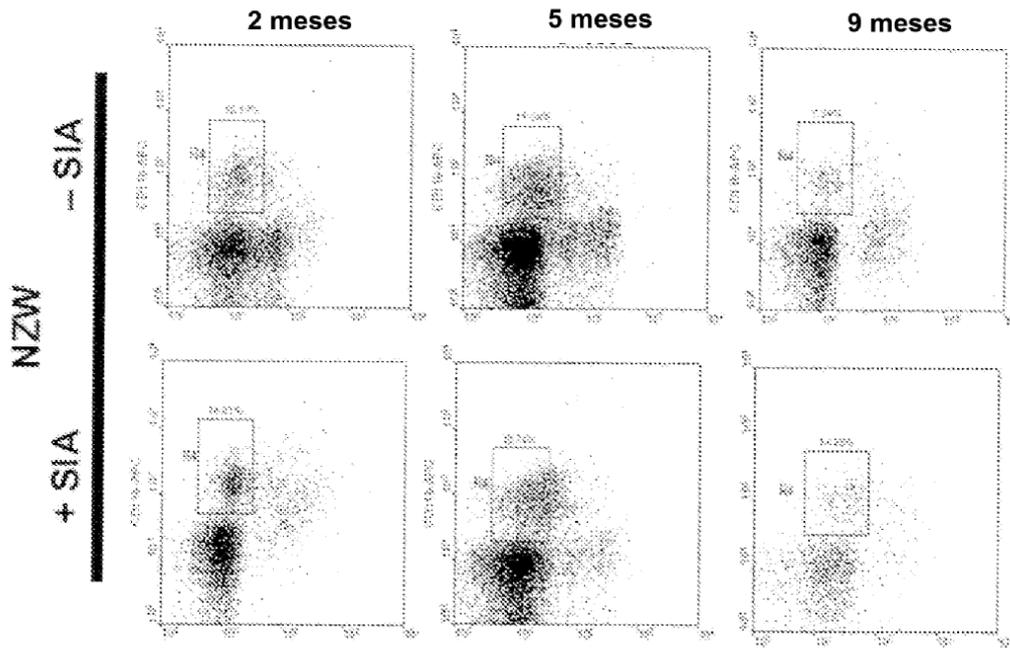


Figura 13A

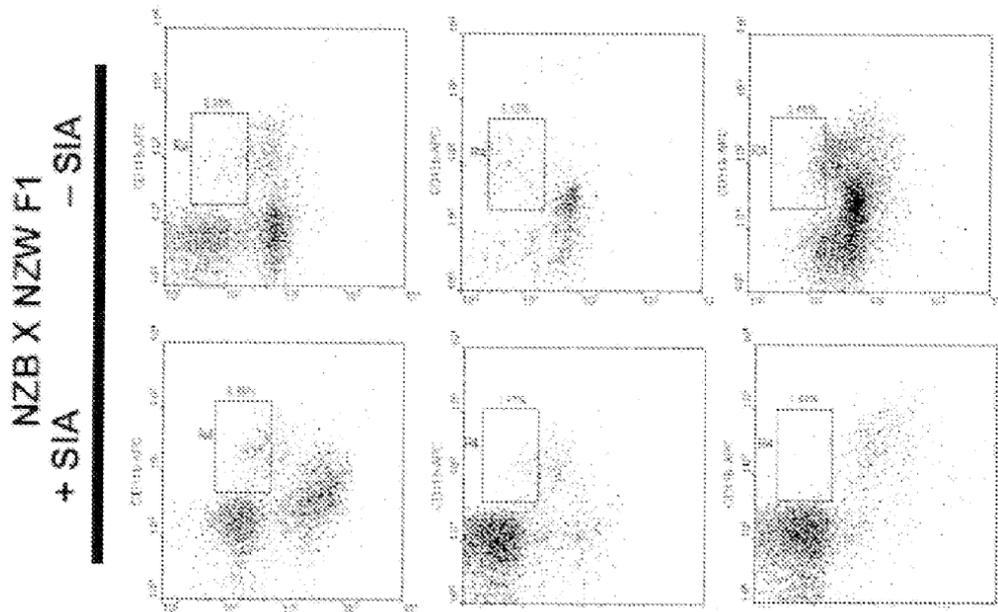


Figura 13B

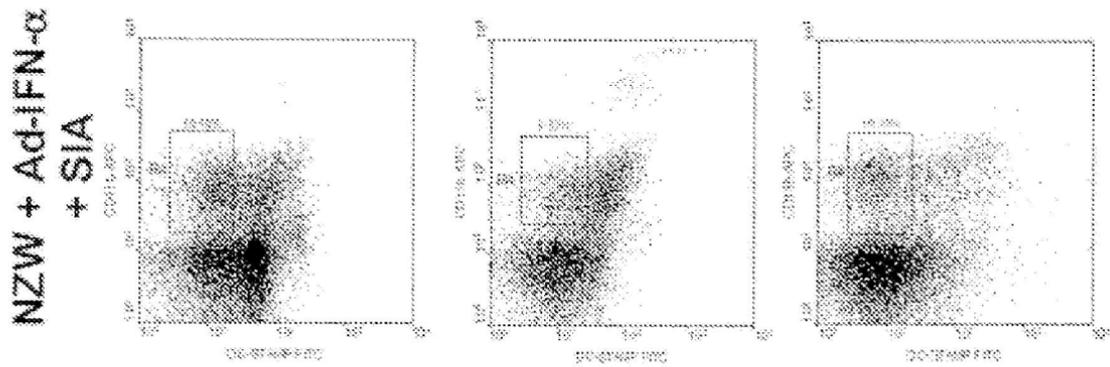


Figura 13C

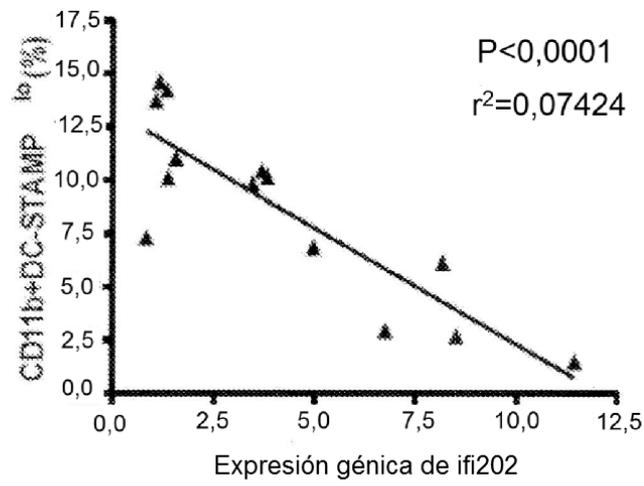


Figura 14A

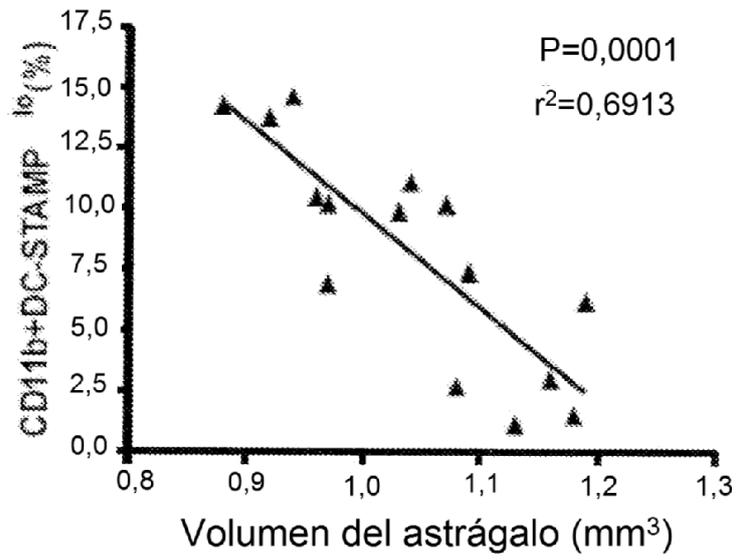


Figura 14B

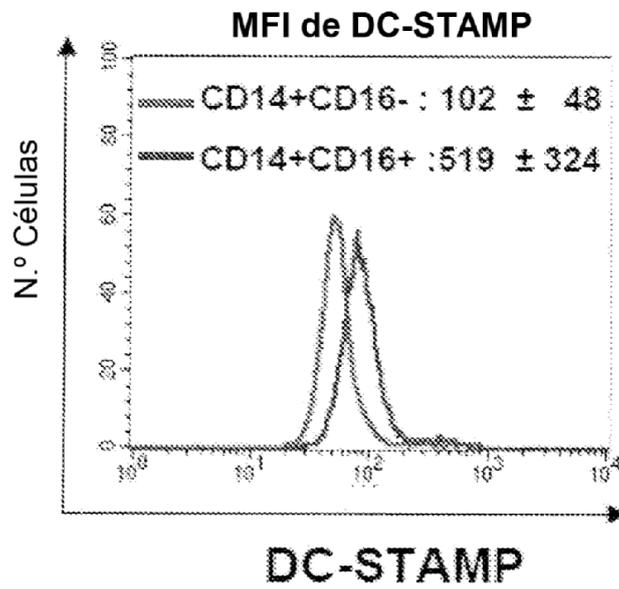


Figura 15A

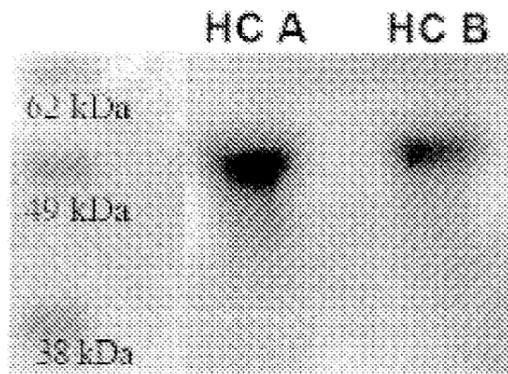


Figura 15B

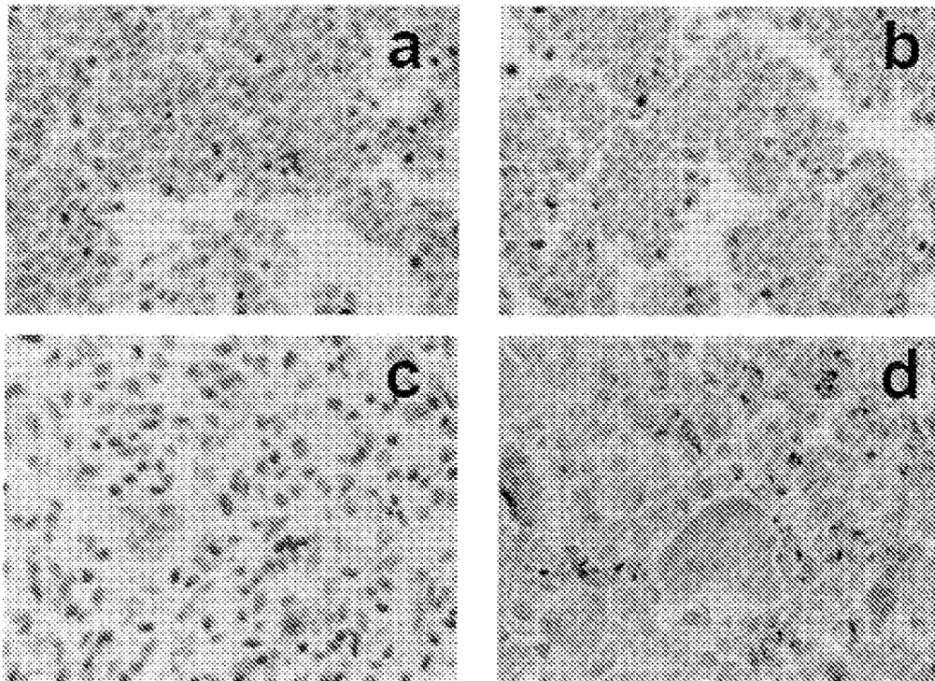


Figura 15C

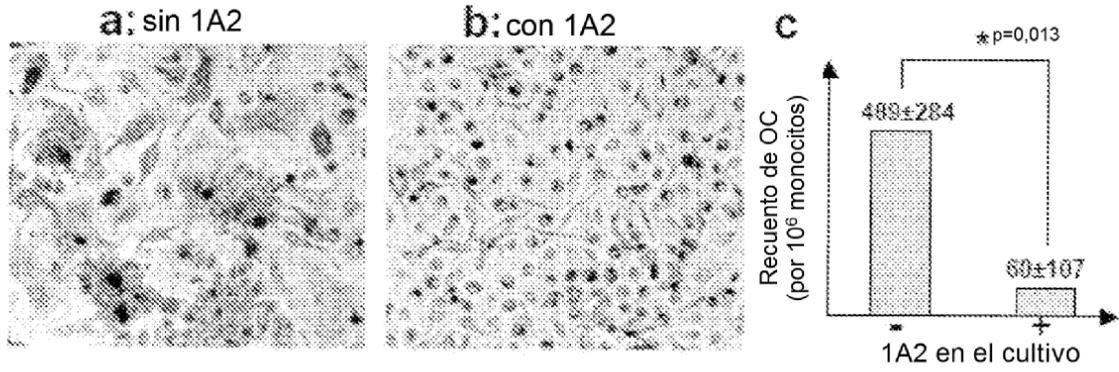


Figura 15D

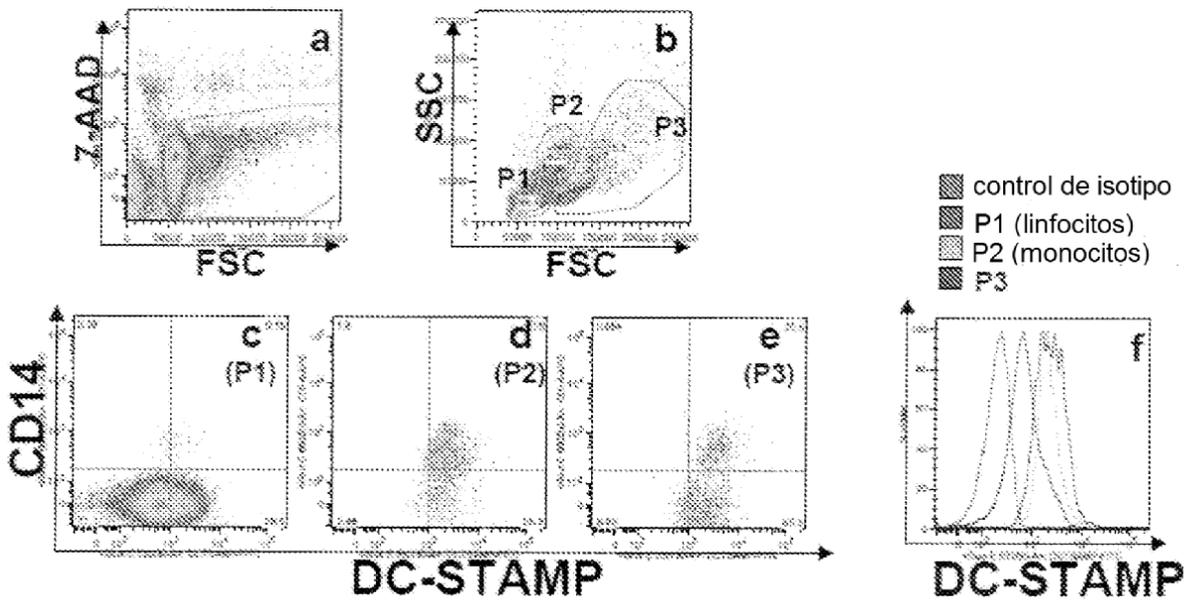


Figura 16A

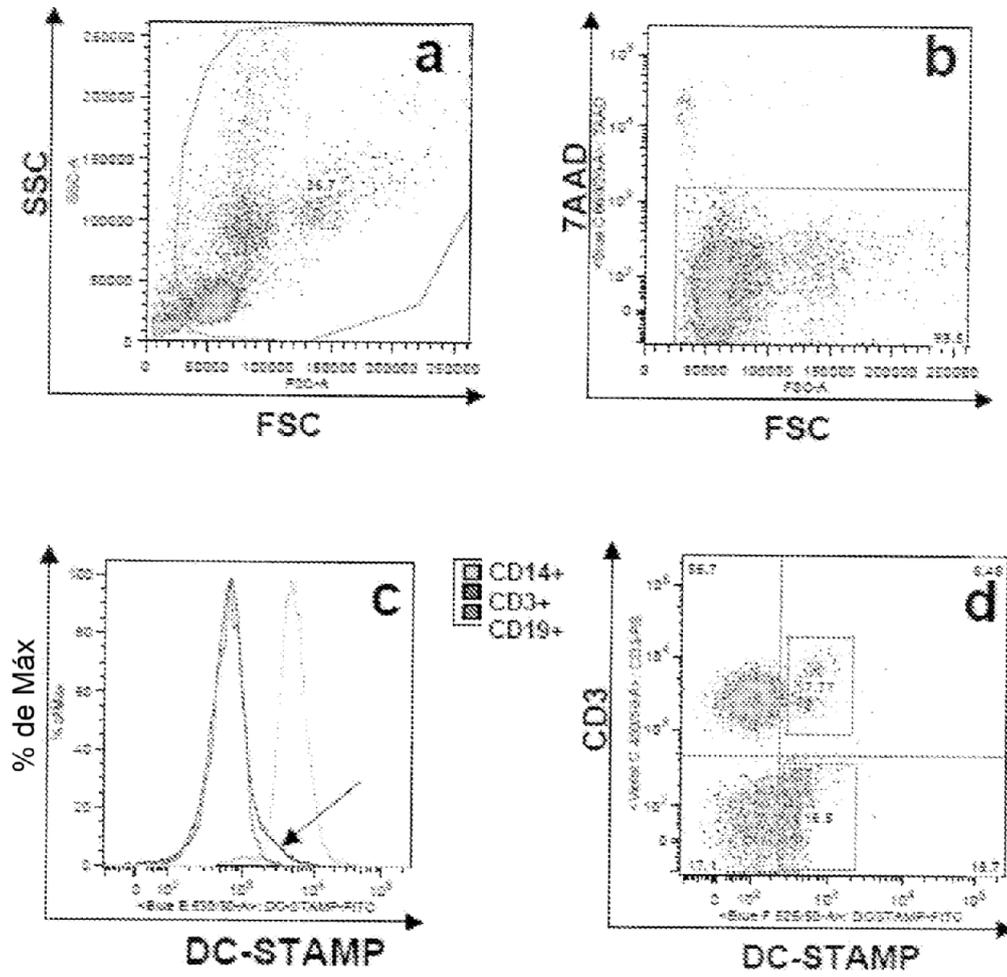


Figura 16B

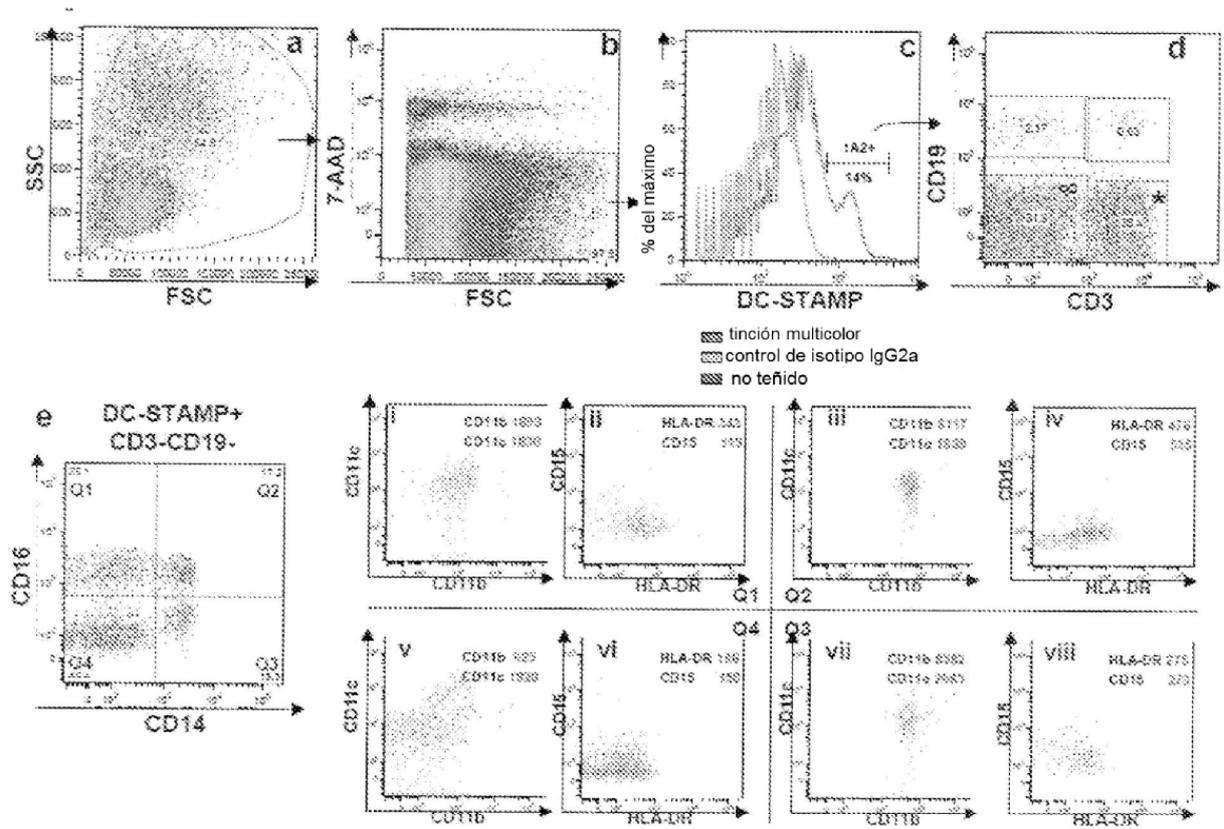


Figura 16C

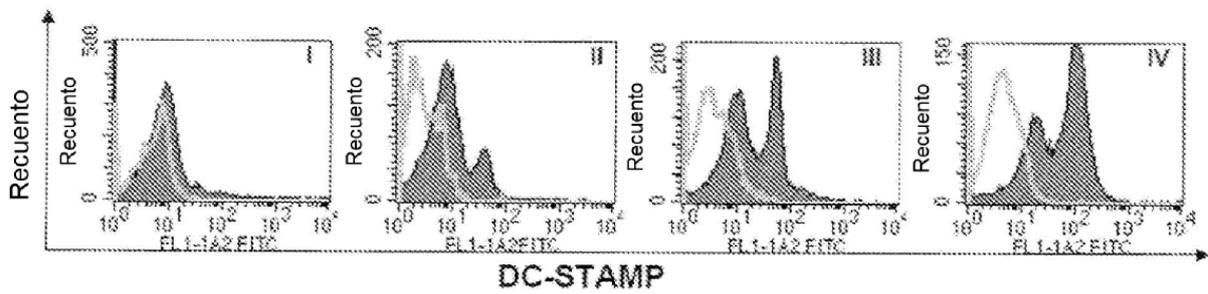


Figura 17A

| Patrón de DC-STAMP | I | II | III | IV |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| N.º de sujetos | | | | |
| control sano | 11 | 0 | 0 | 0 |
| Pacientes PsA | 4 | 6 | 5 | 6 |
| N.º oc (por 10 ⁸ PBMC) | | | | |
| mediana | 50 | 98 | 105 | 203 |
| intervalo intercuartil | 17 - 105 | 21 - 390 | 62 - 131 | 35 - 340 |

Figura 17B

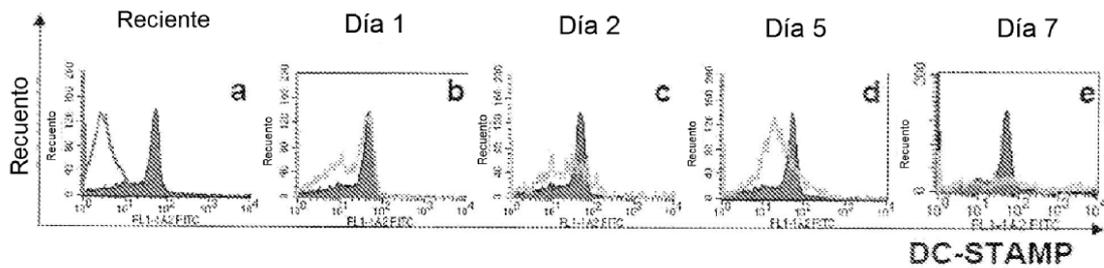


Figura 18A

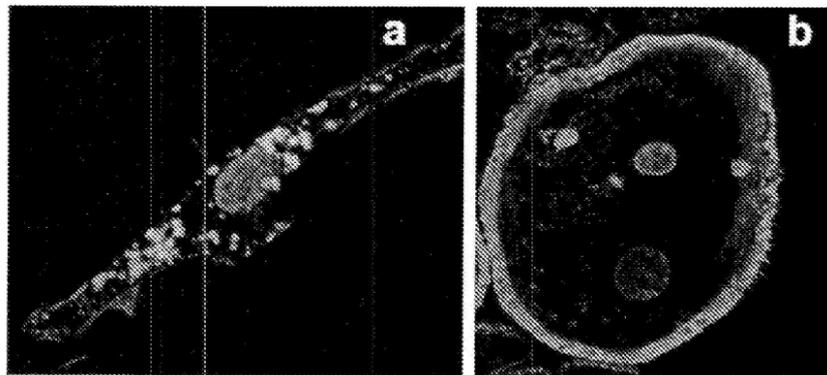


Figura 18B

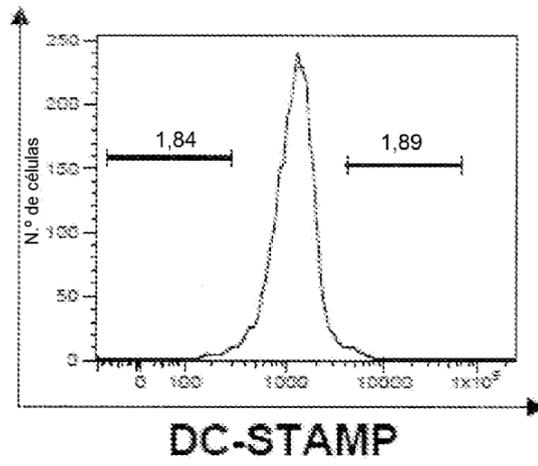


Figura 19A

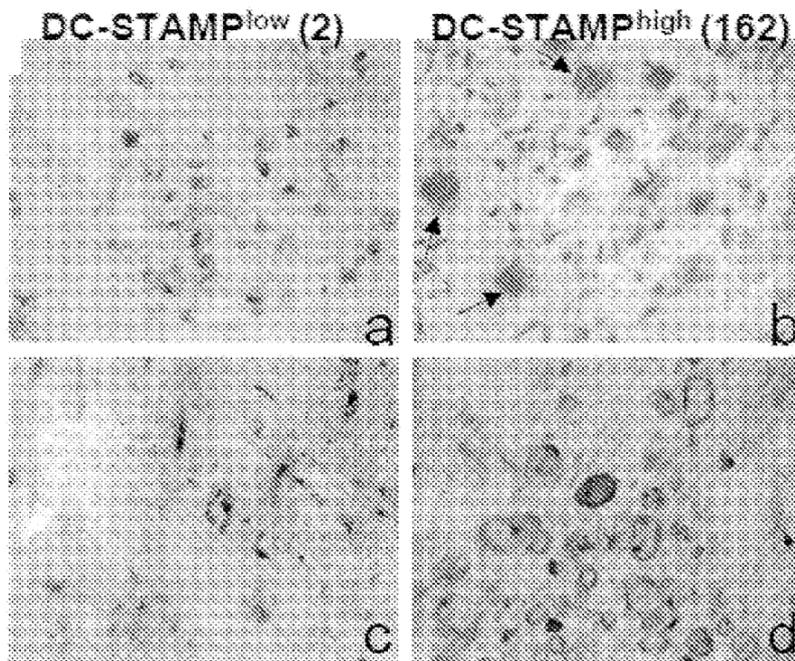


Figura 19B

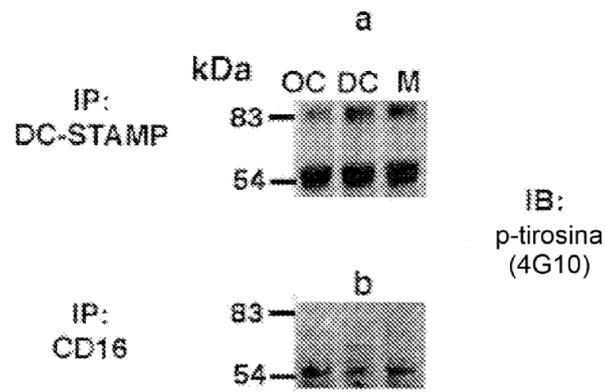


Figura 20A

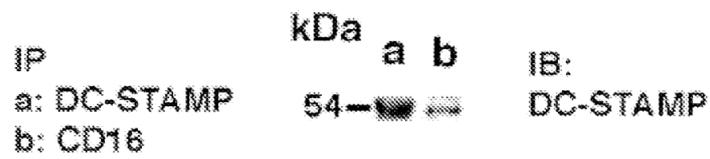


Figura 20B

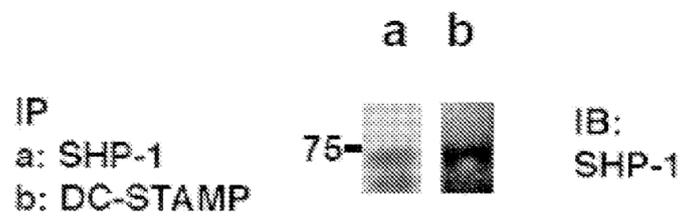


Figura 20C

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 4704692 A [0014]
 • US 4816567 A [0021] [0033] [0034]
 • WO 9429348 A [0022]
 • US 4342566 A [0022]
 • US 4676980 A [0040]
 15 • WO 2006110728 A [0060]
 • WO 207240037 A [0130]
 • US 61174219 B [0130]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 20 • HARLOW ; LANE. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, 1988 [0013] [0015] [0018] [0022]
 • KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0015]
 • GODING. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986, 59-103 [0016]
 25 • KOZBOR, J. *Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0017]
 • BRODEUR et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0017]
 • GRANT. Synthetic Peptides: A User Guide. W.H. Freeman and Co, 1992 [0024]
 • Principles of Peptide Synthesis. Springer Verlag Inc, 1993 [0024]
 30 • DAWSON et al. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*, 1994, vol. 266, 776-9 [0025]
 • BAGGIOLINI et al. *FEBS Lett*, 1992, vol. 307, 97-101 [0025]
 • CLARK et al. *J.Biol.Chem.*, 1994, vol. 269, 16075 [0025]
 • CLARK et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 3128 [0025]
 • RAJARATHNAM et al. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 6623-30 [0025]
 35 • SCHNOLZER et al. *Science*, 1992, vol. 256, 221 [0026]
 • DELISLE et al. Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, 1992, 257-67 [0026]
 • ZOLLER et al. *Nucl. Acids Res.*, 1982, vol. 10, 6487-500 [0028]
 • LONBERG ; HUSZAR. *Int. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0031]
 • JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-5 [0032] [0033]
 40 • RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-7 [0032] [0033]
 • PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-6 [0032]
 • VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-6 [0033]
 • JAKOBOVITS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-5 [0035]
 • JAKOBOVITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-8 [0035]
 45 • BRUGGEMANN et al. *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0035]
 • HOOGENBOOM et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0035]
 • MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0035]
 • COLE et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. 1985, 77 [0035]
 • BOERNER et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0035]
 50 • AMON et al. Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy. 1985, 243-56 [0040]
 • HELLSTROM et al. Controlled Drug Delivery. 1987, 623-53 [0040]
 • THORPE et al. Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications. 1985, 475-506 [0040]
 • Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy. Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy. 1985, 303-16 [0040]
 55 • THORPE et al. *Immunol.*, 1982, vol. 62, 119-58 [0040]
 • SMITH ; WATERMAN. *Adv. Appl. Math*, 1981, vol. 2, 482 [0045]
 • NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0045]
 • PEARSON ; LIPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0045]
 • ZUKER. *Science*, 1989, vol. 244, 48-52 [0046]
 60 • JAEGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 7706-10 [0046]
 • JAEGER et al. *Methods Enzymol.*, 1989, vol. 183, 281-306 [0046]
 • REMINGTON. The Science and Practice of Pharmacy. Lippicott Williams & Wilkins, 2005 [0051]
 • COFFIN et al. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997 [0057]
 • BERKNER et al. *J. Virology*, 1987, vol. 61, 1213-20 [0057]
 65 • MASSIE et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 2872-83 [0057]

- HAJ-AHMAD et al. *J. Virology*, 1986, vol. 57, 267-74 [0057]
- DAVIDSON et al. *J. Virology*, 1987, vol. 61, 1226-39 [0057]
- ZHANG et al. *BioTechniques*, 1993, vol. 15, 868-72 [0057]
- GARCEA ; GISSMANN. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, vol. 15, 513-7 [0058]
- 5 • PEPPERL-KLINDWORTH et al. *Gene Therapy*, 2003, vol. 10, 278-84 [0059]
- MATHIAN et al. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, 2499-506 [0070]
- KEFFER et al. *EMBO J*, 1991, vol. 10, 4025-31 [0071]
- TAKESHITA et al. *J. Bone Miner. Res.*, 2000, vol. 15, 1477-88 [0072] [0091]
- HAYASHI et al. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 27880-6 [0072] [0074] [0088] [0104]
- 10 • SANTINI et al. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 191, 1777-88 [0073]
- FLICK et al. *J. Orthop. Res.*, 2003, vol. 21, 676-84 [0073] [0076]
- KOUSKOFF et al. *Cell*, 1996, vol. 87, 811-22 [0081]
- PROULX et al. *Arthritis Rheum.*, 2007, vol. 56, 4024-37 [0082]
- HUA et al. *Arthritis Rheum.*, 2006, vol. 54, 1906-16 [0083]
- 15 • KUKITA et al. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 200, 941-6 [0086] [0120]
- METLAY et al. *J. Exp. Med.*, 1990, vol. 171, 1753-71 [0088]
- ADACHI et al. *Stem Cells*, 2002, vol. 20, 61-72 [0088]
- LI et al. *Arthritis Rheum.*, 2004, vol. 50, 265-76 [0088]
- ELEVELD-TRANCIKOVA et al. *Leukemia*, 2008, vol. 22, 455-9 [0093]
- 20 • YAO et al. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, 11846-55 [0093]
- SUNDERKOTTER et al. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, 4410-7 [0093]
- CHEN et al. *FEBS Lett.*, 2007, vol. 581, 2181-93 [0095] [0097]
- HEHNING et al. *Sci. Signal*, 2008, vol. 1, ra11 [0096]
- YANG et al. *J. Cell. Physiol.*, 2008, vol. 215, 497-505 [0096]
- 25 • HUANG et al. *Arthritis Res. Ther.*, 2003, vol. 5, R49-59 [0100]
- SATO et al. *J. Exp. Med.*, 2006, vol. 203, 2673-82 [0100]
- TAKAYANAGI et al. *Nature*, 2002, vol. 416, 744-9 [0103]
- ROZZO et al. *Immunity*, 2001, vol. 15, 435-43 [0106]
- SANTIAGO-RABER et al. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 197, 777-88 [0106]
- 30 • YOKOYAMA et al. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2006 [0108]
- CHIU et al. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, vol. 12, R14 [0109] [0115] [0117]
- SANDOR et al. *Immunol. Lett.*, 1996, vol. 54, 123-7 [0116]
- NIMMERJAHN ; RAVETCH. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, 34-47 [0116]
- JARRIN ; ANDRIEUX. *MethodsMol. Biol.*, 1999, vol. 96, 21-8 [0119]
- 35 • ESWARAKUMAR et al. *Immunogenetics*, 1997, vol. 46, 249-50 [0119]
- MORRISON. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2001 [0119]
- SAWTANI et al. *Int. Immunol.*, 2008, vol. 20, 1259-68 [0124]
- ELEVELD-TRANCIKOVA et al. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, vol. 77, 337-43 [0124]
- LISENBEE et al. *Traffic*, 2003, vol. 4, 491-501 [0124]