

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 735**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2002 E 09156995 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2087908**

54 Título: **Anticuerpos para OPGL**

30 Prioridad:

**26.06.2001 US 301172 P**

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

**12.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

**ES 2 675 735 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 para OPGL

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen al ligando de osteoprotegerina (OPGL). También se describen composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades óseas, tales como osteoporosis, pérdida de hueso por artritis, enfermedad de Paget y osteopenia.

Antecedentes de la invención

10 El tejido óseo proporciona soporte para el cuerpo e incluye minerales (incluido calcio y fósforo), una matriz de proteínas colágenas y no colágenas, y células. El tejido óseo vivo exhibe un equilibrio dinámico entre la formación de hueso, que se llama deposición y descomposición del hueso, que se denomina resorción. Tres tipos de células se encuentran en el hueso, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos, están involucrados en este equilibrio. Los osteoblastos promueven la formación de tejido óseo mientras que los osteoclastos están asociados con la resorción. La resorción, o la disolución de la matriz ósea y el mineral, es un proceso rápido y eficiente en comparación con la formación de hueso y puede liberar grandes cantidades de mineral del hueso. Los osteoclastos están implicados en la regulación de la remodelación normal del tejido esquelético y en la resorción inducida por las hormonas. Por ejemplo, la resorción es estimulada por la secreción de hormona paratiroidea en respuesta a la disminución de las concentraciones de ion calcio en los fluidos extracelulares. Por el contrario, la inhibición de la resorción es una función de la calcitonina. Además, los metabolitos de la vitamina D alteran la respuesta del hueso a la hormona paratiroidea y la calcitonina.

20 De experimentos en los que el OPGL soluble recombinante (denominado sODF) provocó la resorción ósea de manera dependiente de la concentración, Tsukii y colaboradores llegaron a la conclusión de que OPGL (denominado "ODF") desempeña un papel crítico en la resorción del hueso en el microambiente del hueso. Los experimentos demostraron que la actividad de OPGL podría inhibirse ya sea por osteoprotegerina ("OPG", denominada "OCIF") o un anticuerpo policlonal anti-ODF, y que tanto OCIF como el anticuerpo policlonal anti-ODF podría bloquear la resorción ósea inducida por cualquiera de  $1\alpha$ , 25-dihidroxitamina  $D_3$ , hormona paratiroidea o prostaglandina  $E_2$  (Tsukii, K., y col., (1998) Biochem. Biophys. Res. Comm., 246: 337 - 341).

30 Nagai y colaboradores aislaron un nuevo ADNc que codifica una forma C-terminal secretada de OPGL (denominado "sODF/TRANCE") de tres líneas celulares de células de carcinoma de células escamosas en las cuales los tejidos malignos originales habían causado hipercalcemia humoral severa. El medio acondicionado por estas células cancerosas contenía la proteína que reacciona con anticuerpo policlonal de conejo específico para el dominio extracelular de ODF/TRANCE humano, y cuando se cultivan en este medio acondicionado las células HL60 (células de leucemia promieloblástica humana) se diferencian en células similares a osteoclastos. Esta la diferenciación fue inhibida por el anticuerpo policlonal de conejo, lo que sugiere que sODF/TRANCE juega un papel importante en la resorción ósea mejorada en la hipercalcemia humoral de neoplasia. (Nagai, M. y col., (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm., 269: 532-536).

35 El ligando de osteoprotegerina (OPGL), que es un miembro de la familia de citocinas TNF, promueve la formación de osteoclastos mediante la unión al activador del receptor de NF- $\kappa$ B (RANK, también llamado diferenciación de osteoclastos y receptor de activación, o ODAR). La osteoprotegerina (OPG), por otro lado, inhibe la formación de osteoclastos al secuestrar OPGL y prevenir la asociación de OPGL con ODAR. Por lo tanto, la cantidad de OPGL asociado con ODAR se correlaciona con el equilibrio entre la deposición y la resorción ósea.

40 Después de la madurez esquelética, la cantidad de hueso en el esqueleto refleja el equilibrio (o desequilibrio) de la formación de hueso y la resorción ósea. La masa ósea máxima se produce después de la maduración esquelética antes de la cuarta década. Entre la cuarta y la quinta década, el equilibrio cambia y la resorción ósea domina. La disminución inevitable de la masa ósea con el avance de los años comienza antes en las mujeres que en los hombres y se acelera característicamente después de la menopausia en algunas mujeres (principalmente las de origen caucásico y asiático).

45 La osteopenia es una condición que se relaciona generalmente con cualquier disminución en la masa ósea por debajo de los niveles normales. Tal condición puede surgir de una disminución en la tasa de síntesis ósea o un aumento en la tasa de destrucción ósea o ambas. Una forma común de osteopenia es la osteoporosis primaria, también conocida como osteoporosis posmenopáusica y senil. Esta forma de osteoporosis es una consecuencia de la pérdida universal de hueso con la edad y, a menudo, es el resultado del aumento de la resorción ósea con una tasa normal de formación de hueso.

50 Muchas mujeres blancas en los Estados Unidos desarrollan osteoporosis sintomática. Existe una relación directa entre la osteoporosis y la incidencia de fractura de cadera, fémur, cuello e intertrocanterica en mujeres de 45 años en adelante. Los hombres de edad avanzada pueden desarrollar osteoporosis sintomática entre las edades de 50 y 70. La osteoporosis puede, en ciertos casos, ser el resultado del aumento de los niveles o la actividad de OPGL. Por lo tanto, sería útil tener moléculas que puedan regular la actividad de OPGL en la osteoclastogénesis.

55 Se han identificado varios factores que pueden contribuir a la osteoporosis posmenopáusica y senil. Ellos incluyen la alteración en los niveles hormonales que acompañan al envejecimiento y el consumo inadecuado de calcio atribuido a la disminución de la absorción intestinal de calcio y otros minerales. Ciertos tratamientos han incluido terapia hormonal o suplementos dietéticos en un intento de retardar el proceso. Más recientemente, han surgido agentes antiresorción tales como bisfosfonatos y modificadores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) para la prevención y el tratamiento de

la masa ósea reducida. Por lo tanto, puede ser útil combinar esos tratamientos con moléculas que puedan regular la actividad de OPGL en el tratamiento de ciertos trastornos osteopénicos.

Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones

- 5 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, y la cadena ligera comprende una secuencia DE aminoácido como se expone en SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.
- 10 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma, y en la que la cadena ligera comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma.
- 15 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma.
- Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma.
- 20 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.
- Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en la que la cadena ligera comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma.
- 25 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, (a) en la que la cadena pesada comprende una primera región variable, y en la que la primera región variable comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 13, y (b) en la que la cadena ligera comprende una segunda región variable, y en la que la segunda región variable comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 14, y (c) en la que el anticuerpo interactúa con un ligando de osteoprotegerina (OPGL).
- 30 En ciertos aspectos, la primera región variable comprende una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable comprende una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con el amino secuencia de ácido expuesta en SEQ ID NO: 14.
- 35 En ciertos aspectos, la primera región variable comprende una secuencia que tiene al menos un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13, y la segunda región variable comprende una secuencia que tiene al menos un 99% de identidad con el aminoácido secuencia de ácido expuesta en SEQ ID NO: 14.
- Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma. Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan una cadena pesada que comprende una región variable y una región constante, en la que la región variable comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma.
- 40 Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma. Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma.
- 45 En ciertos aspectos de la divulgación se proporcionan anticuerpos de cadena sencilla. En ciertos aspectos de la divulgación se proporcionan anticuerpos Fv de cadena sencilla. En ciertos aspectos de la divulgación se proporcionan anticuerpos Fab. En ciertos aspectos de la divulgación se proporcionan anticuerpos Fab'. En ciertos aspectos de la divulgación se proporcionan anticuerpos (Fab')<sub>2</sub>.
- En ciertos aspectos de la divulgación se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la divulgación. En ciertos aspectos se proporciona, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para OPGL de la divulgación.
- 50 En ciertos aspectos de la divulgación, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo para OPGL y al menos un agente terapéutico seleccionado de un factor morfogénico óseo, factorβ de crecimiento transformante (TGF-β), un inhibidor de interleuquina-1 (IL-1), IL-1ra, Kineret™, un inhibidor de TNFα, un receptor de TNFα soluble, Enbrel™, un anticuerpo anti-TNFα, Remicade™, un anticuerpo D2E7, un hormona paratiroidea, un análogo de una hormona paratiroidea, una proteína relacionada con la hormona paratiroidea, un análogo de una proteína relacionada con la hormona paratiroidea, una prostaglandina, un bisfosfonato, un alendronato, fluoruro, calcio, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un Inhibidor de COX-2, Celebrex™, Vioxx™; un inmunosupresor, metotrexato, leflunomida, un
- 55

- 5 inhibidor de serina proteasa, un inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores (SLPI), un inhibidor para IL-6, un anticuerpo para IL-6, un inhibidor para IL-8, un anticuerpo para IL-8, un inhibidor para IL-18, una proteína de unión a IL-18, un anticuerpo IL-18, un modulador de enzima convertidora de interleuquina-1 (ICE), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un modulador de FGF, un antagonista de PAF, un factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), una molécula relacionada con KGF, un modulador de KGF; un modulador de matriz metaloproteinasas (MMP), un modulador de óxido nítrico sintasa (NOS), un modulador del receptor de glucocorticoide, un modulador del receptor de glutamato, un modulador de niveles de lipopolisacárido (LPS), una noradrenalina, un mimético de noradrenalina y un modulador de noradrenalina.
- 10 En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona un método para tratar un trastorno osteopénico, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo. En ciertos aspectos de la divulgación se proporciona un método para tratar un trastorno osteopénico que comprende administrar una composición farmacéutica.
- En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona un método para tratar una afección inflamatoria con pérdida ósea concomitante en un paciente que comprende administrar una composición farmacéutica.
- 15 En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona un método para tratar una afección autoinmune con pérdida ósea concomitante en un paciente que comprende administrar una composición farmacéutica.
- En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona un método para tratar la artritis reumatoide en un paciente, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención.
- En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona un método para detectar el nivel de OPGL en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo.
- 20 Breve descripción de las figuras
- La figura 1 muestra una secuencia de ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo  $\alpha$ OPGL-1 (SEQ ID NO: 1).
- La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo de la  $\alpha$ OPGL - 1 (SEQ ID NO: 2).
- La figura 3 muestra una secuencia de ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo  $\alpha$ OPGL-1 (SEQ ID NO: 3).
- La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo de la  $\alpha$ OPGL - 1 (SEQ ID NO: 4).
- 25 La figura 5 muestra un diagrama esquemático del plásmido  $\alpha$ OPGL-1-Kappa/pDSRa19 de expresión de la cadena ligera kappa  $\alpha$ OPGL-1
- La figura 6 muestra un diagrama esquemático del plásmido  $\alpha$ OPGL-1-IgG2/pDSRa19 de expresión de la cadena pesada de  $\alpha$ OPGL-1 IgG2
- La figura 7 muestra la unión dependiente de la dosis de  $\alpha$ OPGL-1 a placas de EIA recubiertas con OPGL.
- 30 La figura 8 muestra la unión específica de  $\alpha$ OPGL-1 a OPGL unida a membrana.
- La figura 9 muestra la inhibición de la unión de  $\alpha$ OPGL-1 a placas de EIA recubiertas con OPGL mediante OPGL soluble.
- La figura 10 muestra unión específica de  $\alpha$ OPGL-1 a placas de EIA recubiertas con OPGL.
- La figura 11 muestra la inhibición dependiente de la dosis de la formación de osteoclastos por  $\alpha$ OPGL-1.
- La figura 12 muestra la inhibición dependiente de la dosis de la unión de OPGL a ODAR por  $\alpha$ OPGL - 1.
- 35 La figura 13 muestra los perfiles de tiempo de concentración sérica media después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus*.
- La figura 14 muestra el cambio porcentual medio en la concentración de N-Tx en suero después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus*.
- 40 La figura 15 muestra el cambio porcentual medio en la concentración de N-Tx en orina después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus*.
- La figura 16 muestra los perfiles de tiempo de concentración de suero positivos y negativos de anticuerpos después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus*.
- La figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de  $\alpha$ OPGL-1 (SEQ ID NO: 13).
- 45 La figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de  $\alpha$ OPGL-1 (SEQ ID NO: 14).
- La figura 19 muestra un proceso de cultivo celular para la producción de  $\alpha$ OPGL-1.
- La figura 20 muestra el porcentaje de calcio sérico cambiado después de administrar una única dosis de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus*.

La figura 21 muestra el cambio porcentual de fosfatasa alcalina en suero media después de administrar una sola dosis de αOPGL-1 a monos *Cynomolgus*.

Descripción detallada

5 Los títulos de las secciones utilizados en este documento son solo para fines de organización y no deben interpretarse como una limitación del tema descrito.

Definiciones

10 Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en este documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria son las bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar pueden usarse para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

20 Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

25 El término "polinucleótido aislado" como se usa en la presente memoria significará un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "proteína aislada" al que se hace referencia aquí significa una proteína codificada por ADNc, ARN recombinante u origen sintético o alguna combinación de los mismos, que (1) está libre de al menos algunas proteínas con las que normalmente se encontraría, (2) es esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza.

30 El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a proteínas nativas, o secuencias que tienen delecciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. El término "polipéptido" también abarca αOPGL-1 (como se describe a continuación, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4), o secuencias que tienen delecciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de αOPGL-1. En ciertos aspectos de la divulgación comprenden la molécula de inmunoglobulina de cadena pesada humana representada por la figura 2 (SEQ ID NO: 2) y la molécula de inmunoglobulina de cadena ligera humana representada por la figura. 4 (SEQ ID NO: 4), o fragmentos o análogos de los mismos.

40 El término de "origen natural" tal como se usa en la presente memoria como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluidos virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otro modo es de origen natural.

El término "operativamente ligado" como se usa en el presente documento se refiere a componentes que están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, una secuencia de control "operativamente ligada" a una secuencia codificante se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

45 El término "secuencia de control", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que pueden afectar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control puede diferir dependiendo del organismo huésped. Las secuencias de control para procariontes pueden incluir promotor, sitio de unión ribosomal y secuencia de terminación de la transcripción; las secuencias de control para eucariotes pueden incluir promotores y secuencia de terminación de la transcripción; las "secuencias de control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias compañeras de fusión.

El término "polinucleótido" como se denomina aquí significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, las bases pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadena simple o doble.

55 El término "oligonucleótido" al que se hace referencia en este documento incluyen nucleótidos naturales y modificados unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos de origen natural y/o no naturales. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente comprende una longitud de 200 bases o menos. En ciertos aspectos de esta realización los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases de longitud, o los oligonucleótidos tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena sencilla o cadena doble, por

ejemplo, para uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos divulgados en este documento pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

El término "nucleótidos naturales" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces de oligonucleótidos" incluye enlaces de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Ver, por ejemplo, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford, Inglaterra (1991)); Stec et al. Pat. U.S. No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para detección.

La identidad y la similitud de los polipéptidos y relacionados se pueden calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad se describen en programas de ordenador disponibles públicamente. Los métodos preferidos del programa informático para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., supra (1990)). El conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

Ciertos esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la coincidencia de solo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta, aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los que se determinará el porcentaje de identidad de secuencia están alineados para una coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el "lapso correspondiente", según lo determinado por el algoritmo). Una penalización de abertura de espacio (que se calcula como 3X la diagonal media; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se usa; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácidos por la matriz de comparación particular) y una penalización de extensión de espacio (que es usualmente 1/10 veces la penalización de apertura de espacio), así como una matriz de comparación como PAM 250 o BLOSUM 62 pueden ser usadas conjuntamente con el algoritmo. Una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5 (3) (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 10915 - 10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) también es utilizado por el algoritmo.

Los parámetros para una comparación de secuencia polipeptídica pueden incluir los siguientes:

Algoritmo: Needleman et al., J. Mol. Biol., 48: 443 - 453 (1970);  
 Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., Supra (1992);  
 Pena de espacio: 12  
 Penalización de longitud de espacio: 4  
 Umbral de similitud: 0

El programa GAP puede ser útil con los parámetros anteriores. En ciertas realizaciones, los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para las comparaciones de polipéptidos (junto con la ausencia de penalización para los espacios finales) usando el algoritmo GAP.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology-A Synthesis (2ª Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales, como los aminoácidos  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disustituidos, los aminoácidos N-alquilo, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos divulgados en este documento de la presente invención. Entre los ejemplos de aminoácidos no convencionales se incluyen: 4-hidroxi prolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N, N, N-trimetilisina,  $\epsilon$ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina,  $\sigma$ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación de polipéptidos usada en este documento, la dirección a mano izquierda es la dirección de la terminal amino y la dirección a mano derecha es la dirección de la terminal carboxi, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo a mano izquierda de las secuencias de polinucleótido de cadena sencilla es el extremo 5'; la dirección a mano izquierda de las secuencias polinucleotídicas de doble cadena se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5'a 3' de las transcripciones de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcripto de ARN se denominan "secuencias corriente arriba"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcripto de ARN se denominan "secuencias corriente abajo".

Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden abarcar residuos de aminoácidos no naturales, que se incorporan típicamente por síntesis de péptidos químicos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de restos de aminoácidos.

Los residuos naturales se pueden dividir en clases basadas en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 1) hidrófobo: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) Ácido: Asp, Glu;
- 4) básico: His, Lys, Arg;
- 5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- 6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al hacer tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga. Ellos son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptófano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5).

La importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende en la técnica. Kyte et al., J. Mol. Biol., 157: 105 - 131 (1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y aún retener una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, se puede incluir la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ . Se pueden incluir aquellos que están dentro de  $\pm 1$ , o se pueden incluir aquellos dentro de  $\pm 0.5$ .

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar eficazmente sobre la base de la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológicamente funcional creado de ese modo está destinado a su uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. En ciertos aspectos la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, según se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+ 3.0  $\pm$  1); glutamato (+ 3.0  $\pm$  1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5  $\pm$  1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3); fenilalanina (-2.5) y triptófano (-3.4). Al hacer cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se puede incluir la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de  $\pm 2$ , se pueden incluir aquellos que están dentro de  $\pm 1$ , o se pueden incluir aquellos dentro de  $\pm 0.5$ . También se pueden identificar epítomos de secuencias de aminoácidos primarios sobre la base de hidrofiliidad. Estas regiones también se conocen como "regiones centrales epitópicas"

Ejemplos de sustituciones de aminoácidos se exponen en la Tabla 1.

45 TABLA 1 Sustituciones de aminoácidos

Residuos Originales	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gin, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn

Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ácido diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido como se establece en la presente usando técnicas bien conocidas. Un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad al dirigirse a regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. En ciertos aspectos divulgados en este documento, se pueden identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En ciertos aspectos, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservativas de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura polipeptídica.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifiquen residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, se puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en una proteína que corresponden a residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad o estructura en proteínas similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos residuos de aminoácidos importantes predichos.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en la materia puede predecir la alineación de residuos de aminoácidos de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales en los residuos de aminoácidos que se predice que estarán en la superficie de la proteína, ya que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la materia puede generar variantes de prueba que contienen una única sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Las variantes se pueden cribar luego usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular da como resultado una actividad destruida, indeseablemente reducida o inadecuada, pueden evitarse variantes con tal cambio. En otras palabras, en base a la información recopilada a partir de tales experimentos rutinarios, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que se deben evitar sustituciones adicionales, ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

Se han dedicado varias publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Ver Moulton J., Curr. Op. en Biotech., 7 (4): 422 - 427 (1996), Chou et al., Biochemistry, 13 (2): 222 - 245 (1974); Chou et al., Biochemistry, 113 (2): 211 - 222 (1974); Chou et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45 - 148 (1978); Chou et al., Ann. Rev. Biochem., 47: 251 - 276 y Chou et al., Biophys. J., 26: 367 - 384 (1979). Además, los programas de ordenador están actualmente disponibles para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en el modelo de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más del 30% o una similitud mayor del 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos de proteínas estructurales (PDB) ha proporcionado una mayor predictibilidad de la estructura secundaria, incluido el número potencial de pliegues dentro de la estructura de un polipéptido o proteína. Ver Holm et al., Nucl. Ácid. Res., 27 (1): 244 - 247 (1999). Se ha sugerido (Brenner et al., Curr. Op. Struct. Biol., 7 (3): 369-376 (1997)) que hay un número

limitado de pliegues en un polipéptido o proteína dado y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural será dramáticamente más precisa.

Los métodos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen en "threading" (Jones, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7 (3): 377 - 87 (1997); Sippl et al., *Structure*, 4 (1): 15 - 19 (1996)), "profile analysis" (Bowie et al., *Science*, 253: 164 - 170 (1991); Gribskov et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84 (13): 4355-4358 (1987)), y "evolutionary lineage" (Ver Holm, *supra* (1999), y Brenner, *supra* (1997)).

En ciertos aspectos divulgados en este documento, las variantes de anticuerpo incluyen variantes de glicosilación en las que el número y/o el tipo de sitio de glicosilación se ha alterado en comparación con las secuencias de aminoácidos del polipéptido parental. En ciertos aspectos divulgados en este documento, las variantes de proteína comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos a N que la proteína nativa. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier resto de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidratos ligada a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de carbohidrato ligada a N existente. También se proporciona una redistribución de cadenas de carbohidrato ligadas a N en las que se eliminan uno o más sitios de glicosilación ligados a N (típicamente los que se producen de forma natural) y se crean uno o más sitios nuevos ligados a N. Las variantes de anticuerpo preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que uno o más residuos de cisteína se eliminan o sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos parental. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos deben replegarse en una conformación biológicamente activa tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína generalmente tienen menos residuos de cisteína que la proteína nativa, y típicamente tienen un número par para minimizar las interacciones resultantes de las cisteínas desapareadas.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran afinidades de unión, y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en dichos polipéptidos. Las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (que pueden incluir sustituciones de aminoácidos conservativas) pueden realizarse en la secuencia de origen natural (que incluyen en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares). Una sustitución conservativa de aminoácidos típicamente no puede cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia parental). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias polipeptídicas reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

El término "fragmento polipeptídico" como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino terminal y/o carboxi terminal. En ciertos aspectos divulgados, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5 a 467 aminoácidos. Se apreciará que, en ciertos aspectos divulgados aquí, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de longitud.

Los análogos de péptidos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptidos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* p.392 (1985); y Evans et al. *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987). Dichos compuestos a menudo se desarrollan con la ayuda de modelos moleculares computarizados. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles, se pueden usar para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado de:  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$ ,  $-\text{CH-CH-}$  (cis y trans),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH(OH)CH}_2-$  y  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse en ciertos aspectos para generar péptidos más estables. Además, los péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar puentes de disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

"Anticuerpo" o "péptido (s) de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. En ciertos aspectos, los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante. En ciertos aspectos, los fragmentos de unión se producen por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

El término "cadena pesada" incluye cualquier polipéptido que tenga una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad para un OPGL. El término "cadena ligera" incluye cualquier polipéptido que tenga una secuencia de región variable suficiente para conferir especificidad por un OPGL. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V<sub>H</sub>, y tres dominios de región constante, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. El dominio V<sub>H</sub> está en el terminal

- amino del polipéptido, y el dominio C<sub>H3</sub> está en el terminal carboxi. El término “cadena pesada”, como se usa en el presente documento, abarca una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, V<sub>L</sub>, y un dominio de región constante, C<sub>L</sub>. Al igual que la cadena pesada, el dominio de la región variable de la cadena ligera está en el terminal amino del polipéptido. El término “cadena ligera”, como se usa en el presente documento, abarca una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma. Un fragmento Fab está compuesto por una cadena ligera y las regiones C<sub>H1</sub> y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento Fab' contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F (ab')<sup>2</sup>. La región Fv comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, pero carece de las regiones constantes. Los anticuerpos de cadena sencilla son moléculas Fv en las que las regiones variables de cadena pesada y ligera se han conectado mediante un enlazador flexible para formar una única cadena polipeptídica que forma una región de unión a antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se discuten en detalle en WO 88/01649 y en la patente de EE.UU. Nos. 4,946,778 y 5,260,203.
- Se entiende que un anticuerpo bivalente distinto de un anticuerpo “multiespecífico” o “multifuncional”, en ciertas realizaciones, típicamente se entiende que cada uno tiene sus sitios de unión idénticos.
- Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un ligando a un receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más (tal como se mide en un ensayo de unión competitiva in vitro).
- El término “epítopo” incluye cualquier polipéptido determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertos aspectos, los determinantes de epítopos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo, y, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítopo es una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo. En ciertos aspectos, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En ciertos aspectos, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , en ciertos aspectos, cuando la constante de disociación es  $\leq 100 \text{ nM}$ , y en ciertos aspectos, cuando la constante de disociación es  $\leq 10 \text{ nM}$ .
- El término “agente” se usa en el presente documento para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto fabricado a partir de materiales biológicos.
- Como se usa en este documento, los términos “marcador” o “marcado” se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido o un aminoácido radiomarcado a un polipéptido de restos de biotina que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En ciertos aspectos de la divulgación, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas y se pueden usar. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, sustancias luminiscentes de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano silvestre, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, biotínilo, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, cremallera de leucina) secuencias pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos). En ciertas realizaciones, las etiquetas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial de impedimento estérico.
- El término “muestra biológica”, como se usa en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o cosa que vivía anteriormente. Tales seres vivos incluyen, pero no se limitan a, humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, nódulos linfáticos y piel.
- El término “trastorno osteopénico” incluye, pero no se limita a, osteoporosis, osteopenia, enfermedad de Paget, metástasis óseas líticas, periodontitis, artritis reumatoide y pérdida de hueso debido a la inmovilización. Además de estos trastornos óseos, se sabe que ciertos cánceres aumentan la actividad de los osteoclastos e inducen la resorción ósea, tal como de mama, de próstata y el mieloma múltiple. Ahora se sabe que estos cánceres producen factores que resultan en la sobreexpresión de OPGL en el hueso y conducen a un aumento en el número y la actividad de los osteoclastos.
- El término “agente farmacéutico o fármaco” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente.
- El término “modulador”, como se usa en este documento, es un compuesto que cambia o altera la actividad o función de una molécula. Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En ciertos aspectos, un modulador es un inhibidor, que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Ciertas actividades y funciones de ejemplo de una molécula incluyen, pero no se limitan a, afinidad de unión, actividad enzimática y transducción de señal. Ciertos inhibidores de ejemplo incluyen, pero no se limitan

a, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los pepticuerpos se describen, por ejemplo, en WO01/83525.

Como se usa en la presente memoria, "sustancialmente puro" significa que especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En ciertos aspectos, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En ciertos aspectos, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En ciertos aspectos, la especie objeto se purifica a homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y animales.

En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término que incluye, así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, los términos como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

El ligando de osteoprotegerina (OPGL), un miembro de la familia de citocinas del factor de necrosis tumoral (TNF), está involucrado en la formación de osteoclastos. El aumento de la actividad de los osteoclastos se correlaciona con una serie de trastornos osteopénicos, que incluyen osteoporosis posmenopáusica, enfermedad de Paget, metástasis óseas líticas y artritis reumatoide. Por lo tanto, una reducción en la actividad de OPGL puede dar como resultado una disminución en la actividad de los osteoclastos y puede reducir la gravedad de los trastornos osteopénicos. De acuerdo con ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos dirigidos a OPGL pueden usarse para tratar trastornos osteopénicos, que incluyen, pero no están limitados a, los mencionados anteriormente.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano contra ligando de osteoprotegerina humana (OPGL). Se divulgan en este documento secuencias de nucleótidos que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, particularmente secuencias correspondientes a las regiones variables. Ciertos aspectos divulgados en este documento, comprenden secuencias correspondientes a regiones determinantes de complementariedad (CDR), específicamente de CDR1 a CDR3. De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona una línea celular de hibridoma que expresa dicha molécula de inmunoglobulina y anticuerpo monoclonal. En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano purificado contra OPGL humana.

La capacidad de clonar y reconstruir los locus humanos de tamaño de megabase en cromosomas artificiales de levadura (YAC) e introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque para dilucidar los componentes funcionales de locus muy grandes o crudamente mapeados, así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de locus de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar información única sobre la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en la inducción y progresión de la enfermedad.

Una aplicación práctica importante de dicha estrategia es la "humanización" del sistema inmune humoral del ratón. La introducción de locus de inmunoglobulina humana (Ig) en ratones en los que los genes de Ig endógenos se han inactivado ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos, así como su papel en el desarrollo de células B. Además, dicha estrategia podría proporcionar una fuente para la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (MAbs). En ciertos aspectos divulgados en este documento, se espera que los anticuerpos completamente humanos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los Mab de ratón derivados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y seguridad de los anticuerpos cuando son administrados. En ciertos aspectos divulgados en este documento, se pueden usar anticuerpos completamente humanos en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como osteoporosis, inflamación, autoinmunidad y cáncer, que pueden implicar administraciones repetidas de anticuerpos.

Se pueden diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los locus de Ig humana, anticipando que tales ratones producirían anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humana pueden preservar la gran diversidad de genes variables así como la regulación adecuada de la producción y expresión de anticuerpos. Explotando la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón puede producir anticuerpos de alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluidos antígenos humanos. Usando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar MAb humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada.

En ciertos aspectos, se pueden usar regiones constantes de especies distintas de las humanas junto con la (s) región (regiones) variable (s) humana (s).

Estructura del anticuerpo de origen natural

Las unidades estructurales de anticuerpos que se producen naturalmente comprenden típicamente un tetrámero. Cada uno de tales tetrámeros típicamente está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una "luz" de longitud completa (en ciertas realizaciones, aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (en ciertas realizaciones, aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye típicamente una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente es responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena típicamente define una región constante que puede ser responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. El IgA se subdivide de manera similar en subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, típicamente, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2da ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada típicamente forman el sitio de unión al antígeno.

Las regiones variables típicamente exhiben la misma estructura general de regiones marco conservadas relativamente (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par típicamente están alineadas por las regiones marco, que pueden permitir la unión a un epítipo específico. Del terminal N al terminal C, las regiones variables tanto de cadena ligera como pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está típicamente de acuerdo con las definiciones de Kabat-Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), or Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

#### Anticuerpos biespecíficos o bifuncionales

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional típicamente es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por una diversidad de métodos que incluyen, pero no se limitan a, fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Ver, por ejemplo, Songvilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

#### Preparación de anticuerpos

Ciertos anticuerpos que se unen específicamente a OPGL se proporcionan por la divulgación. En aspectos de la divulgación, los anticuerpos pueden producirse por inmunización con OPGL de longitud completa, formas solubles de OPGL o un fragmento del mismo. En ciertos aspectos de la divulgación, los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, y/o pueden ser anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos, los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, mediante inmunización de animales transgénicos capaces de producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, solicitud publicada PCT No. WO 93/12227).

En ciertos aspectos de la presente divulgación, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de  $\alpha$ OPGL-1 pueden injertarse en regiones marco (FR) de la misma especie u otra. En ciertos aspectos, las CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada de  $\alpha$ OPGL-1 pueden injertarse en FR humanas de consenso. Para crear FR humanas de consenso, en ciertos aspectos, las FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera humana se alinean para identificar una secuencia de aminoácidos de consenso. En ciertos aspectos, las FR de la cadena pesada  $\alpha$ OPGL-1 o de la cadena ligera se reemplazan por las FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. En ciertos aspectos, los aminoácidos raros en las FR de las cadenas pesada y ligera de  $\alpha$ OPGL-1 no se reemplazan, mientras que el resto de los aminoácidos FR se reemplazan. Los aminoácidos raros son aminoácidos específicos que se encuentran en posiciones en las que generalmente no se encuentran en las FR. En ciertos aspectos, las regiones variables injertadas de  $\alpha$ OPGL-1 pueden usarse con una región constante que es diferente de la región constante de  $\alpha$ OPGL-1. En ciertos aspectos, las regiones variables injertadas son parte de un anticuerpo Fv de cadena simple. El injerto de CDR se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nos. 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089 y 5,530,101.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden preparar mediante la utilización de un ratón transgénico que tiene una porción sustancial del genoma productor de anticuerpos humanos insertado pero que se vuelve deficiente en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Tales ratones, entonces, son capaces de producir moléculas y anticuerpos de inmunoglobulina humana y son deficientes en la producción de moléculas y anticuerpos de inmunoglobulina murina. Las tecnologías utilizadas para lograr este resultado se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la memoria descriptiva, en este documento. Se pueden emplear métodos tales como los descritos en la Solicitud Publicada PCT No. WO 98/24893. Ver también Mendez et al. Nature Genetics 15: 146 - 156 (1997).

De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos para OPGL se pueden producir como sigue. Los ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana se inmunizan con el antígeno de interés. Se obtienen células linfáticas (tales como células B) de ratones que expresan anticuerpos. Tales células recuperadas se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales, y dichas líneas celulares de hibridoma se tamizan y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma

que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En ciertos aspectos, se proporciona la producción de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos específicos para OPGL.

Ciertos aspectos divulgados en este documento, se producen mediante líneas de hibridoma AMG 6.1, AMG 6.4, AMG 6.5, AMG 7.1 y AMG 7.2. Ciertos aspectos divulgados en este documento, se producen mediante líneas de hibridoma AMG 6.1, AMG 6.4 y AMG 6.5. En ciertos aspectos, los anticuerpos se unen a OPGL con una constante de disociación (Kd) de entre aproximadamente 0.23 y 0.29 nM. En ciertos aspectos, los anticuerpos se unen a OPGL con una Kd de menos de 0.23 nM.

En ciertos aspectos, los anticuerpos son del isotipo IgG2. En ciertos aspectos, los anticuerpos comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada IgG2 humana. En ciertos aspectos, los anticuerpos se han clonado para expresión en células de mamífero. En ciertos aspectos, las regiones variables de los anticuerpos se ligan a una región constante distinta de la región constante para el isotipo IgG2.

En ciertos aspectos, las modificaciones conservadoras de las cadenas pesada y ligera de  $\alpha$ OPGL-1 (y en ciertas realizaciones, las modificaciones correspondientes a los nucleótidos codificantes) producirán anticuerpos contra OPGL que tienen características funcionales y químicas similares a las de  $\alpha$ OPGL-1. Por el contrario, pueden lograrse modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de la  $\alpha$ OPGL-1 seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservativa" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo de manera que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede estar sustituido con alanina, como se ha descrito previamente para "mutagénesis de barrido de alanina".

Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) pueden ser determinadas por los expertos en la técnica en el momento en que se desean tales sustituciones. En ciertos aspectos, las sustituciones de aminoácidos se pueden usar para identificar residuos importantes de  $\alpha$ OPGL-1, o para aumentar o disminuir la afinidad de los anticuerpos frente a OPGL descritos en este documento.

Los anticuerpos divulgados en este documento, pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. En ciertos aspectos, las secuencias que codifican anticuerpos particulares pueden usarse para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. De acuerdo con ciertos aspectos, la transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, que incluye, por ejemplo, empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica en la patente de EE.UU. Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 y 4,959,455. En ciertos aspectos, el procedimiento de transformación utilizado puede depender del huésped que se va a transformar. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada con polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen pero no se limitan a células de ovario de hámster chino (CHO), Células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y varias otras líneas celulares. En ciertos aspectos, las líneas celulares pueden seleccionarse determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades constitutivas de unión a OPGL.

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, los anticuerpos de la presente divulgación son útiles para detectar OPGL en muestras biológicas. En ciertos aspectos de la presente divulgación, esto permite la identificación de células o tejidos que producen la proteína. En ciertos aspectos divulgados en este documento, los anticuerpos que se unen a OPGL y bloquean la interacción con otros compuestos de unión pueden tener un uso terapéutico en la modulación de la diferenciación de osteoclastos y la resorción ósea. En ciertos aspectos divulgados en este documento, los anticuerpos contra OPGL pueden bloquear la unión de OPGL a ODAR, lo que puede dar como resultado un bloqueo en la cascada de transducción de señal y la pérdida de la activación de la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B. Los expertos en la técnica conocen los ensayos para medir la activación de la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B usando, por ejemplo, un ensayo reportero de luciferasa.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se divulgan métodos para tratar un trastorno óseo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo a OPGL. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se divulgan métodos para tratar un trastorno óseo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo para OPGL y a otro agente terapéutico. En ciertos de tales aspectos de la presente divulgación, el agente terapéutico adicional se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el trastorno óseo es un trastorno caracterizado por una pérdida ósea neta, que incluye, pero no se limita a, osteopenia y osteólisis. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el tratamiento con un anticuerpo para OPGL se usa para suprimir la tasa de resorción ósea. Por lo tanto, en ciertos aspectos de la presente divulgación, el

tratamiento puede ser usado para reducir la tasa de resorción ósea en la que la tasa de resorción es superior a lo normal, o para reducir la resorción ósea por debajo de los niveles normales para compensar los niveles por debajo de lo normal de formación ósea. En ciertos aspectos de la presente divulgación, los anticuerpos pueden someterse a prueba para determinar la unión a OPGL en ausencia o presencia de OPG y examinarse para determinar su capacidad para inhibir la osteoclastogénesis mediada por OPGL y/o la resorción ósea.

Las condiciones que pueden tratarse de acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, incluyen, entre otras, las siguientes:

Osteoporosis, que incluye, pero no está limitada a, osteoporosis primaria, osteoporosis endocrina (que incluye, pero no está limitada a, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing y acromegalia), formas hereditarias y congénitas de osteoporosis (que incluyen, pero no están limitadas a, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes, síndrome de Riley-Day) y osteoporosis debido a la inmovilización de las extremidades;

Enfermedad ósea de Paget (osteítis deformans) en adultos y jóvenes;

Osteomielitis, es decir, una lesión infecciosa en el hueso, que conduce a la pérdida ósea;

Hipercalcemia, que incluye, pero no está limitada a, hipercalcemia causada por tumores sólidos (que incluyen, pero no está limitada a, mama, pulmón y riñón) y por neoplasias hematológicas (que incluyen, pero no están limitadas a, mieloma múltiple, linfoma y leucemia), hipercalcemia idiopática, e hipercalcemia asociada con hipertiroidismo y trastornos de la función renal;

Osteopenia, que incluye, pero no está limitada, osteopenia posterior a la cirugía, osteopenia inducida por administración de esteroides, osteopenia asociada con trastornos del intestino delgado y grueso y osteopenia asociada con enfermedades hepáticas y renales crónicas;

Osteonecrosis, es decir, muerte de células óseas, que incluye, pero no se limita a, osteonecrosis asociada con lesión traumática, osteonecrosis asociada con la enfermedad de Gaucher, osteonecrosis asociada con anemia de células falciformes, osteonecrosis asociada con lupus eritematoso sistémico, osteonecrosis asociada con artritis reumatoide, osteonecrosis asociada con enfermedad periodontal, osteonecrosis asociada con metástasis osteolítica y osteonecrosis asociada con otras afecciones; y

Pérdida de cartílago y erosión articular asociada con la artritis reumatoide.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL puede ser usado solo o con al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento de trastornos óseos. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se usa un anticuerpo para OPGL junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden administrarse con un anticuerpo para OPGL incluyen, pero no se limitan a, los factores morfogénicos óseos designados BMP-1 a BMP-12; factor  $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) y miembros de la familia TGF- $\beta$  inhibidores de interleuquina-1 (IL-1), que incluyen, pero no se limitan a IL-1ra y derivados de la misma y Kineret™; Inhibidores de TNF $\alpha$ , que incluyen, pero no se limitan a, receptores de TNF $\alpha$  solubles, Enbrel™, anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , anticuerpos Remicade™ y D2E7; hormona paratiroidea y análogos de los mismos; proteína relacionada con paratiroides y análogos de los mismos; Prostaglandinas de la serie E; bisfosfonatos (tales como alendronato y otros); minerales que mejoran los huesos como fluoruro y calcio; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de COX-2, tales como Celebrex™ y Vioxx™; inmunosupresores, tales como metotrexato o leflunomida; inhibidores de serina proteasa, que incluyen, pero no se limitan a, inhibidor de proteasa de leucocitos secretores (SLPI); Inhibidores de IL-6 (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos para IL-6), inhibidores de IL-8 (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos para IL-8); Inhibidores de IL-18 (que incluyen, pero no se limitan a, proteína de unión a IL-18 y anticuerpos de IL-18); Moduladores de la enzima convertidora de interleuquina-1 (ICE); moduladores de factores de crecimiento de fibroblastos FGF-1 a FGF-10 y FGF; Antagonistas de PAF; factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), moléculas relacionadas con KGF y moduladores de KGF; moduladores de metaloproteinasas de matriz (MMP); Moduladores de óxido nítrico sintasa (NOS), que incluyen, pero no se limitan a, moduladores de NOS inducible; moduladores del receptor de glucocorticoides; moduladores del receptor de glutamato; moduladores de los niveles de lipopolisacáridos (LPS); y noradrenalina y moduladores y miméticos de los mismos.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se usa un anticuerpo para OPGL con agentes terapéuticos particulares para tratar diversas afecciones inflamatorias, afecciones autoinmunes u otras afecciones con pérdida ósea concomitante. En ciertos aspectos de la presente divulgación, a la vista de la afección y el nivel deseado de tratamiento, se pueden administrar dos, tres o más agentes. En ciertos aspectos de la presente divulgación, tales agentes se pueden proporcionar juntos por inclusión en la misma formulación. En ciertos aspectos de la presente divulgación, tales agentes y un anticuerpo para OPGL se pueden proporcionar juntos por inclusión en la misma formulación. En ciertos aspectos de la presente divulgación, tales agentes se pueden proporcionar juntos por inclusión en un kit de tratamiento. En ciertos aspectos de la presente divulgación, tales agentes y un anticuerpo para OPGL se pueden proporcionar juntos por inclusión en un kit de tratamiento. En ciertos aspectos de la presente divulgación, tales agentes se pueden proporcionar por separado. En ciertos aspectos de la presente divulgación, cuando se administran por terapia génica, los genes que codifican los agentes proteicos y/o un anticuerpo para OPGL pueden incluirse en el mismo vector. En ciertos aspectos, los genes que codifican agentes proteicos y/o un anticuerpo para OPGL pueden estar bajo el control de la misma región promotora. En ciertos aspectos, los genes que codifican los agentes proteicos y/o un anticuerpo para OPGL pueden estar en vectores separados.

En ciertos aspectos, la presente divulgación está dirigida a terapias que comprenden un anticuerpo para OPGL y al menos un inhibidor de interleuquina-1 (IL-1), y métodos para el tratamiento usando tales terapias. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una terapia comprende un anticuerpo para OPGL y un inhibidor de IL-1 y al menos una molécula adicional descrita en este documento. En ciertos aspectos de la presente divulgación, los métodos de tratamiento usan inhibidores de IL-1 y/o inhibidores de TNF- $\alpha$  en conjunción con un anticuerpo para OPGL. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se puede usar un anticuerpo para OPGL en combinación con inhibidores de IL-1 y/o inhibidores de TNF-a para el tratamiento de afecciones tales como asma, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

La interleuquina-1 (IL-1) es una citocina antiinflamatoria. En ciertos casos, IL-1 es un mediador en muchas enfermedades y condiciones médicas. En ciertos casos, IL-1 es fabricado por células del linaje de macrófagos/monocitos. En ciertos casos, IL-1 se produce en dos formas: IL-1 alfa (IL-1  $\alpha$ ) e IL-1 beta (IL-1  $\beta$ ).

Una enfermedad o afección médica se considera una "enfermedad mediada por interleuquina-1" si la enfermedad espontánea o experimental o la afección médica está asociada con niveles elevados de IL-1 en los fluidos corporales o en los tejidos y/o si las células o los tejidos extraídos del cuerpo produce niveles elevados de IL-1 en cultivo. En ciertos aspectos de la presente divulgación, tales enfermedades mediadas por interleuquina-1 también se reconocen por las siguientes dos condiciones adicionales: (1) los hallazgos patológicos asociados con la enfermedad o afección médica pueden imitarse experimentalmente en animales mediante la administración de IL-1 o la regulación positiva de la expresión de IL-1; y (2) una patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o afección médica puede inhibirse o anularse mediante el tratamiento con agentes que inhiben la acción de IL-1. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una o más de las condiciones anteriores se cumplen en una enfermedad mediada por IL-1. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las tres condiciones se cumplen en una enfermedad mediada por IL-1.

Las enfermedades mediadas por interleuquina-1 (IL-1) aguda y crónica incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: pancreatitis aguda; esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig); Enfermedad de Alzheimer; caquexia/anorexia, que incluye, pero no se limita a, caquexia inducida por SIDA; asma y otras enfermedades pulmonares; aterosclerosis; vasculitis autoinmune; síndrome de fatiga crónica; Enfermedades asociadas a Clostridium, que incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia cardíaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (por ejemplo, relacionada con la sepsis), e injerto de derivación de la arteria coronaria; cáncer, que incluye, pero no se limita a, leucemias, que incluyen, pero no se limitan a, leucemia de mieloma múltiple y mielógena (por ejemplo, AML y CML) y metástasis tumoral; diabetes (que incluye, pero no se limita a, diabetes insulino dependiente); endometriosis; fiebre; fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad de injerto contra huésped y/o rechazo de trasplante; shock hemorrágico; hiperalgesia; Enfermedad inflamatoria intestinal; afecciones inflamatorias de una articulación, que incluyen, pero no se limitan a, osteoartritis, artritis psoriásica y artritis reumatoide; enfermedad ocular inflamatoria, que incluye, pero no se limita a, aquellas asociadas con, por ejemplo, trasplante de córnea; isquemia, que incluye, pero no se limita a, isquemia cerebral (que incluye, pero no se limita a, lesión cerebral como resultado de, por ejemplo, trauma, epilepsia, hemorragia o apoplejía, cada una de las cuales puede conducir a la neurodegeneración); La enfermedad de Kawasaki; deterioro del aprendizaje; enfermedades pulmonares (que incluyen, pero no se limitan a, síndrome de dificultad respiratoria aguda o SDR); esclerosis múltiple; miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteína muscular, que incluye, pero no se limita a, metabolismo de proteínas musculares en sepsis); neurotoxicidad (que incluye, pero no se limita a, dicha afección inducida por el VIH); osteoporosis; dolor, que incluye, pero no se limita a, dolor relacionado con el cáncer; Enfermedad de Parkinson; enfermedad periodontal; parto prematuro; psoriasis; lesión por reperfusión; choque séptico; efectos secundarios de la radioterapia; enfermedad temporal de la articulación mandibular; alteración del sueño; uveitis; y una afección inflamatoria que resulta de, por ejemplo, tensión, esguince, daño del cartílago, trauma, cirugía ortopédica, infección u otros procesos de enfermedad.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, un inhibidor de IL-1 puede ser cualquier proteína o molécula capaz de prevenir específicamente la activación de receptores celulares a IL-1, que puede resultar de cualquier cantidad de mecanismos. Los mecanismos de ejemplo incluyen, pero no están limitados a, regulación negativa de la producción de IL-1, unión de IL-1 libre, interferencia con la unión de IL-1 a su receptor, interfiriendo con la formación del complejo receptor de IL-1 (es decir, asociación del receptor IL-1 con la proteína accesoria del receptor de IL-1) e interferencia con la modulación de la señalización de IL-1 después de unirse a su receptor.

Ciertos inhibidores de interleuquina-1 incluyen, pero no se limitan a, antagonistas del receptor de IL-1, que incluyen, entre otros, Kineret™, IL-1ra, variantes de IL-1ra y derivados de IL-1ra, que se denominan colectivamente "Proteínas IL-1ra"; anticuerpos monoclonales del receptor anti-IL-1 (véase, por ejemplo, el documento EP 623674); Proteínas de unión a IL-1, que incluyen, pero no se limitan a, receptores de IL-1 solubles (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,492,888, la Patente de Estados Unidos No. 5,488,032, y la Patente de Estados Unidos No. 5,464,937, la Patente de Estados Unidos No. 5,319,071, y la Patente de Estados Unidos No. 5,180,812; anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (véanse, por ejemplo, los documentos WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, U.S. Pat. No.4,935,343, EP 364778, EP 267611 y EP 220063; Proteínas accesorias y anticuerpos del receptor de IL-1 (véanse, por ejemplo, los documentos WO 96/23067 y WO 99/37773; inhibidores de la enzima convertidora de interleuquina-1 beta (ICE) o caspasa I (véanse, por ejemplo, los documentos WO 99/46248, WO 99/47545 y WO 99/47154, que pueden usarse para inhibir la producción y secreción de IL-1 beta; inhibidores de la interleuquina-1-beta-proteasa; y otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis in vivo o la liberación extracelular de IL-1.

Los ejemplos de inhibidores de IL-1 se divulgan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nos. 5,747,444; 5,359,032; 5,608,035; 5,843,905; 5,359,032; 5,866,576; 5,869,660; 5,869,315; 5,872,095; 5,955,480; 5,965,564; Solicitudes de patente internacional (WO) 98/21957, 96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174, 95/34326, 99/36426, 99/36415; Las solicitudes de patente europea (EP) 534978 y 894795; y la solicitud de patente francesa FR 2762514.

El antagonista del receptor de la interleuquina-1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como un inhibidor natural de la interleuquina-1 y es un miembro de la familia IL-1, que incluye IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ciertos antagonistas del receptor, que incluyen IL-1ra y variantes y derivados de los mismos, así como los métodos para prepararlos y usarlos, se describen en la patente de EE.UU. No. 5,075,222; WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; y WO 99/36541. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un antagonista del receptor de IL-1 puede estar glicosilado. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un antagonista del receptor de IL-1 puede estar no glicosilado.

Tres formas de IL-1ra y sus variantes se describen en la patente de EE.UU. No. 5,075,222 (la patente '222). La primera forma, llamada "IL-1" en la patente '222, se caracteriza como una molécula de 22-23 kD en SDS-PAGE con un punto isoelectrónico aproximado de 4.8, que eluye de una columna de FPLC Mono Q en aproximadamente 52 mM de NaCl, en tampón Tris, pH 7.6. La segunda forma, IL-1ra $\beta$ , se caracteriza como una proteína de 22-23 kD, que eluye de una columna Mono Q en 48 mM de NaCl. Tanto la IL-1ra $\alpha$  como la IL-1ra $\beta$  están glicosiladas. La tercera forma, IL-1ra $\gamma$ , se caracteriza como una proteína de 20 kD, que eluye de una columna Mono Q a 48 mM de NaCl y no está glicosilada. La patente '222 también describe ciertos métodos para aislar genes que codifican los inhibidores, clonando esos genes en vectores adecuados, transformando y transfectando esos genes en ciertos tipos de células, y expresando esos genes para producir los inhibidores.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, las delecciones, inserciones y/o sustituciones (individualmente o colectivamente denominadas "variante(s)") se realizan dentro de las secuencias de aminoácidos de IL-1ra. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una variante de IL-1ra es biológicamente activa (por ejemplo, posee la capacidad de inhibir IL-1).

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se divulgan terapias que comprenden un anticuerpo para OPGL y al menos un inhibidor de TNF $\alpha$  y métodos de tratamiento usando tales terapias. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una terapia comprende un anticuerpo para OPGL y un inhibidor de TNF $\alpha$  y al menos una molécula adicional descrita en este documento.

Ciertas enfermedades y afecciones médicas están mediadas por el TNF y pueden categorizarse como afecciones inflamatorias. Como se usa en el presente documento, una "enfermedad mediada por TNF" incluye, pero no se limita a, una enfermedad o afección médica que se asocia con niveles elevados de TNF en fluidos corporales o tejidos y/o en la que células o tejidos extraídos del cuerpo producen niveles elevados de TNF en cultivo. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una enfermedad es una enfermedad mediada por TNF si (1) los hallazgos patológicos asociados con la enfermedad o condición médica pueden imitarse experimentalmente en animales mediante la administración o regulación positiva de la expresión de TNF y/o (2) una patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o condición médica pueden inhibirse o abolirse mediante el tratamiento con agentes que inhiben la acción del TNF.

Ciertas enfermedades mediadas por TNF agudas y crónicas incluyen, pero no están limitadas a: caquexia y anorexia; cáncer, que incluye, pero no se limita a, leucemia; síndrome de fatiga crónica; condiciones y/o indicaciones coronarias, que incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia cardíaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (que incluye pero no se limita a tal estado relacionado con la sepsis), e injerto de derivación de la arteria coronaria; depresión; diabetes, que incluye, pero no se limita a, diabetes tipo 1 de aparición juvenil, diabetes mellitus y resistencia a la insulina (que incluye, pero no se limita a, resistencia a la insulina asociada con la obesidad); endometriosis, endometritis y afecciones relacionadas; fibromialgia y analgesia; rechazo de injerto contra huésped; hiperalgesia; enfermedades inflamatorias del intestino, que incluyen, entre otras, la enfermedad de Crohn y la diarrea asociada a Clostridium difficile; isquemia, que incluye, pero no se limita a, isquemia cerebral, que incluye, pero no se limita a, lesión cerebral como resultado de trauma, epilepsia, hemorragia y/o apoplejía; enfermedad pulmonar, que incluye, pero no se limita a, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, asma y fibrosis pulmonar; esclerosis múltiple; enfermedades neuroinflamatorias; enfermedades y afecciones oculares, que incluyen, pero no se limitan a, trasplante de córnea, degeneración ocular y uveítis; dolor, que incluye, pero no se limita a, dolor relacionado con el cáncer; pancreatitis; enfermedades periodontales; Pitiriasis rubra pilaris (PRP); prostatitis, incluyendo prostatitis bacteriana y no bacteriana, y afecciones relacionadas; psoriasis y afecciones relacionadas; fibrosis pulmonar; lesión por reperfusión; enfermedades reumáticas, que incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil (que incluye, pero no se limita a, artritis reumatoide juvenil), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, enfermedad de Still, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis sistémica, vasculitis (por ejemplo, enfermedad de Kawasaki), vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos, ("séptica"), síndrome de Sjögren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de células gigantes); choque séptico; efectos colaterales de la radioterapia; lupus eritematoso sistémico (LES); enfermedad temporal de la articulación mandibular; tiroiditis; y trasplante de tejido y/o una afección inflamatoria, por ejemplo, resultante de tensión, esguince, daño del cartílago, trauma, cirugía ortopédica, infección (por ejemplo, VIH, Clostridium difficile y especies relacionadas) u otro proceso de enfermedad.

- En ciertos aspectos de la presente divulgación, los inhibidores de TNF pueden actuar por al menos uno de la producción reguladora o inhibidora de TNF, uniéndose a TNF libre, interfiriendo con la unión de TNF a su receptor, e interfiriendo con la modulación de señalización de TNF después de unirse a su receptor. El término "inhibidor de TNF" incluye, pero no se limita a, receptores de TNF solubilizados, que incluyen, pero no se limitan a, receptor soluble del factor de necrosis tumoral tipo I (sTNF-RI, también llamado receptor p55), receptor soluble del factor de necrosis tumoral tipo II (también llamado receptor p75) y Enbrel™; anticuerpos contra TNF, que incluyen, pero no se limitan a, Remicade™ y D2E7 (véase, por ejemplo, la patente U.S. Nos. 6,090,382 y 6,258,562); anticuerpos contra el receptor de TNF; sTNF-RI (véase, por ejemplo, WO 98/24463), etanercept (Enbrel™), Avakine™; inhibidores de la enzima convertidora de TNF-α (TACE); y otras moléculas que afectan la actividad de TNF.
- Los ejemplos de inhibidores de TNF-α se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente europea EP 308 378; EP 422 339; EP 393 438; EP 398 327; EP 412 486; EP 418 014, EP 417 563, EP 433 900; EP 464 533; EP 512 528; EP 526 905; EP 568 928; EP 607 776, que describe el uso de leflunomida para la inhibición de TNF-α; EP 663 210; EP 542 795; EP 818 439; EP 664 128; EP 542 795; EP 741 707; EP 874 819; EP 882 714; EP 880 970; EP 648 783; EP 731 791; EP 895 988; EP 550 376; EP 882 714; EP 853 083; EP 550 376; EP 943 616; EP 939 121; EP 614 984; EP 853 083; Pat. U.S. Nos. 5,136,021; 5,929,117; 5,948,638; 5,807,862; 5,695,953; 5,834,435; 5,817,822; 5,830,742; 5,834,435; 5,851,556; 5,853,977; 5,359,037; 5,512,544; 5,695,953; 5,811,261; 5,633,145; 5,863,926; 5,866,616; 5,641,673; 5,869,677; 5,869,511; 5,872,146; 5,854,003; 5,856,161; 5,877,222; 5,877,200; 5,877,151; 5,886,010; 5,869,660; 5,859,207; 5,891,883; 5,877,180; 5,955,480; 5,955,476; 5,955,435; 5,994,351; 5,990,119; 5,952,320; 5,962,481; Solicitudes de patente internacional WO 90/13575, WO 91/03553, WO 92/01002, WO 92/13095, WO 92/16221, WO 93/07863, WO 93/21946, WO 93M19777, WO 95/34326, WO 96/28546, WO 98/27298, WO 98/30541, WO 96/38150, WO 96/38150, WO 97/18207, WO 97/15561, WO 97/12902, WO 96/25861, WO 96/12735, WO 96/11209, WO 98/39326, WO 98/39316, WO 98/38859, WO 98/39315, WO 98/42659, WO 98/39329, WO 98/43959, WO 98/45268, WO 98/47863, WO 96/33172, WO 96/20926, WO 97/37974, WO 97/37973, WO 97/47599, WO 96/35711, WO 98/51665, WO 98/43946, WO 95/04045, WO 98/56377, WO 97/12244, WO 99/00364, WO 99/00363, WO 98/57936, WO 99/01449, WO 99/01139, WO 98/56788, WO 98/56756, WO 98/53842, WO 98/52948, WO 98/52937, WO 99/02510, WO 97/43250, WO 99/06410, WO 99/06042, WO 99/09022, WO 99/08688, WO 99/07679, WO 99/09965, WO 99/07704, WO 99/06041, WO 99/37818, WO 99/37625, WO 97/11668, WO 99/50238, WO 99/47672, WO 99/48491; Solicitudes de patente japonesa 10147531, 10231285, 10259140 y 10130149, 10316570, 11001481 y 127,800/1991; Solicitud alemana n° 19731521; y las solicitudes británicas nos. 2 218 101, 2 326 881, 2 246 569.
- Los documentos EP 393 438 y EP 422 339 describen las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de un receptor soluble de TNF tipo I (también conocido como sTNFR-I o inhibidor TNF de 30 kDa) y un receptor soluble de TNF tipo II (también conocido como sTNFR-II o Inhibidor TNF de 40 kDa), que se denominan colectivamente "sTNFR". Los documentos EP 393 438 y EP 422 339 también describen formas modificadas de sTNFR-I y sTNFR-II, que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos, derivados funcionales y variantes. Además, los documentos EP 393 438 y EP 422 339 describen métodos para aislar genes que codifican los inhibidores, clonar los genes en vectores adecuados, transformar o transfectar los genes en ciertos tipos de células, y expresar los genes para producir los inhibidores.
- Los sTNFR-I y sTNFR-II son miembros de la superfamilia de receptores del factor de crecimiento nervioso/receptor TNF, que incluye el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF), el antígeno CD40 de las células B, 4-1BB, el antígeno de células T de rata MRC OX40, el antígeno fas, y los antígenos CD27 y CD30 (Smith et al. (1990) Science, 248: 1019-1023). Una característica conservada de ese grupo de receptores de superficie celular es un dominio de unión a ligando extracelular rico en cisteína, que se puede dividir en cuatro motivos repetidos de aproximadamente cuarenta aminoácidos que contienen 4-6 residuos de cisteína en posiciones que están bien conservadas (Smith et al. (1990), *supra*).
- El documento EP 393 438 muestra un inhibidor de TNF Δ51 de 40 kDa y un inhibidor de Δ53 de 40 kDa, que son versiones truncadas de la proteína inhibidora de TNF de 40 kDa de longitud completa recombinante. Δ51 y Δ53 tienen 51 o 53 aminoácidos, respectivamente, eliminados del terminal carboxilo de la proteína madura.
- La Solicitud PCT Publicada No. WO 98/01555 describe formas truncadas de sTNFR-I y sTNFR-II que no contienen el cuarto dominio (residuos de aminoácidos Thr<sup>127</sup>-Asn<sup>161</sup> de sTNFR-I y residuos de aminoácidos Pro<sup>141</sup>-Thr<sup>179</sup> de sTNFR-II); una porción del tercer dominio (residuos de aminoácidos Asn<sup>111</sup>-Cys<sup>126</sup> de sTNFR-I y residuos de aminoácidos Pro<sup>123</sup>-Lys<sup>140</sup> de sTNFR-II); y, opcionalmente, no contienen una porción del primer dominio (residuos de aminoácidos Asp<sup>1</sup>-Cys<sup>19</sup> de sTNFR-I y restos de aminoácidos Leu<sup>1</sup>-Cys<sup>32</sup> de sTNFR-II). En ciertos aspectos de la presente divulgación, los sTNFR truncados incluyen las proteínas representadas por la fórmula R<sub>1</sub>-[Cys<sup>19</sup>-Cys<sup>103</sup>]-R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub>-[Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>115</sup>]-R<sub>5</sub>. Estas proteínas son formas truncadas de sTNFR-I y sTNFR-II, respectivamente.
- Como se usa en este documento, "R<sub>1</sub>-[Cys<sup>19</sup>-Cys<sup>103</sup>]-R" representa una o más proteínas en las que [Cys<sup>19</sup>-Cys<sup>103</sup>] son los residuos 19 a 103 de sTNFR-I, la secuencia de la cual se proporciona en la FIG. 1 de WO 98/01555; en la que R<sub>1</sub> representa un grupo amina metionilado o no metionilado de Cys<sup>19</sup> o uno o más residuos aminoácidos amino-terminales seleccionados de Cys<sup>18</sup> a Asp<sup>1</sup>; y en la que R<sub>2</sub> representa un grupo carboxi de Cys<sup>103</sup> o uno o más residuos de aminoácidos carboxi terminales seleccionados de Phe<sup>104</sup> a Leu<sup>110</sup>.
- Los sTNFR-I truncados de ejemplo de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, sTNFR-I 2.6D/C105, sTNFR-I 2.6D/C106, sTNFR-I 2.6D/N105, sTNFR-I 2.3D/d8, sTNFR-I 2.3D/d18, sTNFR-I 2.3D/d15, tanto metionilado como no metionilado, y variantes y derivados de los mismos. Ciertos sTNFR-I truncados de ejemplo se describen, por ejemplo, en la Solicitud PCT publicada No. WO 98/01555.

Tal como se usa en la presente memoria, "R<sub>3</sub>-[Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>115</sup>]-R<sub>4</sub>" representa una o más proteínas en las que [Cys<sup>32</sup>-Cys<sup>115</sup>] son residuos Cys<sup>32</sup> hasta Cys<sup>115</sup> de sTNFR-II, cuya secuencia se proporciona en la figura 8 de WO 98/01555; en la que R<sub>3</sub> representa un grupo amina metionilado o no metionilado de Cys<sup>32</sup> o uno o más residuos aminoácidos amino terminales seleccionados de Cys<sup>31</sup> a Leu<sup>1</sup>; y en la que R<sub>4</sub> representa un grupo carboxi de Cys<sup>115</sup> o uno o más residuos de aminoácidos carboxi-terminales seleccionados de Ala<sup>116</sup> a Arg<sup>122</sup>.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se divulgan aquí terapias que comprenden un anticuerpo para OPGL y al menos un inhibidor de serina proteasa, y métodos de tratamiento usando tales terapias. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una terapia comprende un anticuerpo para OPGL y un inhibidor de serina proteasa y al menos una molécula adicional descrita en este documento.

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

En ciertos aspectos de la presente divulgación, los inhibidores de proteasa de origen natural sirven para controlar las proteasas endógenas al limitar sus reacciones local y temporalmente. En ciertos aspectos de la presente divulgación, los inhibidores de proteasa pueden inhibir las proteasas introducidas en el cuerpo por agentes infecciosos. En ciertos casos, los tejidos que son particularmente propensos a ataques e infecciones proteolíticas, incluidos, entre otros, los del tracto respiratorio, son ricos en inhibidores de la proteasa.

Los inhibidores de la proteasa comprenden aproximadamente el 10% de las proteínas plasmáticas humanas. Se han aislado al menos ocho inhibidores de esta fuente y se han caracterizado en la literatura. Estos incluyen, pero no están limitados a, alfa 2-macroglobulina (alfa 2M), inhibidor de alfa 1 proteasa (alfa 1PI), alfa 1-antitripsina (alfa 1Achy), alfa 1-anticolagenasa (alfa 1AC) y un inhibidor inter-alfa-tripsina (I-alfa-I).

En ciertos casos, una afectación del equilibrio proteasa/inhibidor de proteasa puede conducir a la destrucción del tejido mediado por proteasa, que incluye, pero no se limita a, enfisema, artritis, glomerulonefritis, periodontitis, distrofia muscular, invasión tumoral y diversas otras afecciones patológicas. En ciertas situaciones, por ejemplo, procesos patológicos severos tales como sepsis o leucemia aguda, la cantidad de enzimas proteolíticas libres presentes pueden aumentar debido a la liberación de la enzima de las células secretoras.

Además, en ciertos casos, una disminución de la capacidad inhibidora reguladora del organismo también puede causar alteraciones en el equilibrio de la proteasa/inhibidor de la proteasa. Un ejemplo no limitante de tal capacidad inhibidora reguladora disminuida es una deficiencia del inhibidor de alfa 1-proteasa, que se correlaciona con el desarrollo de enfisema pulmonar.

En ciertos casos, puede ocurrir daño serio al organismo cuando tales condiciones aberrantes están presentes a menos que se puedan tomar medidas para controlar las enzimas proteolíticas. Por lo tanto, se han buscado inhibidores de la proteasa que puedan administrarse a un organismo para controlar las enzimas proteolíticas.

La elastasa de los leucocitos, la tripsina, la catepsina G y la elastasa pancreática son ejemplos no limitantes de una clase de proteasas conocidas como serina proteasas.

En ciertos casos, la elastasa de los leucocitos, cuando se libera extracelularmente, degrada el tejido conectivo y otras proteínas valiosas. Mientras que un organismo que funciona normalmente degrada una cierta cantidad de tejido conectivo y otras proteínas, la presencia de una cantidad excesiva de elastasa de leucocitos puede estar asociada con varios estados patológicos, que incluyen, pero no se limitan a, enfisema y artritis reumatoide. Para contrarrestar los efectos de la elastasa de leucocitos cuando está presente en cantidades mayores que las normales, se ha buscado un inhibidor de proteasa que sea específico para la elastasa de leucocitos. Tal inhibidor de proteasa puede ser útil si fuera capaz de aislarse o prepararse en una forma purificada y en cantidades suficientes para ser farmacéuticamente útil.

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

En ciertos casos, la tripsina inicia la degradación de cierto tejido de órganos blandos, tal como el tejido pancreático, durante una variedad de afecciones agudas, que incluyen, pero no se limitan a, pancreatitis. Un inhibidor de tripsina puede ser útil si se puede aislar y preparar en una forma purificada y en cantidades suficientes para que sea farmacéuticamente útil.

La catepsina G es otra proteasa presente en los leucocitos. En ciertas realizaciones, la catepsina G es capaz de degradar una variedad de proteínas *in vitro*, incluidas las de la ruta del complemento. La elastasa pancreática es otra proteasa que puede tener un papel en la pancreatitis. Por lo tanto, los inhibidores de estas proteasas también pueden ser de valor farmacéutico.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se cree que la especificidad del sustrato y la sensibilidad a diferentes inhibidores de serina proteasas son el resultado de cambios en solo unos pocos residuos de aminoácidos. Por analogía, puede ser posible concebir una clase de inhibidores de serina proteasa en la que los cambios en relativamente pocos

aminoácidos darán como resultado la inhibición de diferentes proteasas. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un miembro de esta clase inhibe cada serina proteasa.

Un ejemplo de inhibidor de serina proteasa es el inhibidor de proteasa de leucocitos secretores (SLPI) y fragmentos y análogos de los mismos. Los ejemplos de inhibidores de serina proteasa también incluyen, pero no se limitan a, anti-leucoproteasa (ALP), inhibidor de proteasa mucosa (MPI), inhibidor de plasma seminal humano-1 (HUSI-1), inhibidor de moco bronquial (BMI) e inhibidor de moco cervical (CUSI). En ciertos aspectos de la presente divulgación, los inhibidores de serina proteasas también pueden ser moduladores de LPS. Ver, por ejemplo, Jin et al. (1997), Cell 88 (3): 417 - 26. En ciertos aspectos de la presente divulgación, estas moléculas son muy adecuadas para usar en condiciones que conducen a la pérdida ósea porque están dirigidas preferentemente al cartílago.

Los ejemplos de inhibidores de serina proteasas se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No.4,760,130; Pat. U.S. No. 5,900,400; y la patente de los EE. UU. No. 5,633,227. Las moléculas descritas en las referencias anteriores, así como sus variantes o análogos se denominan colectivamente "inhibidores de serina proteasa".

La IL-18 es una citocina proinflamatoria que se encontró que induce interferón- $\gamma$  y se denominó anteriormente factor inductor de interferón gamma (IGIF). En ciertos casos, se ha demostrado que IL-1 regula positivamente la producción de IL-18, e IL-18 induce la producción de varias citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-6 y MMP-1. Ver, por ejemplo, Dinarello et al. (1998), J. Leukocyte Biol. 63: 658-64. En ciertos casos, la caspasa I también es importante para la producción de IL-18. Los experimentos también sugieren que el TNF- $\alpha$  regula la producción de IL-18 y que la inhibición simultánea de TNF- $\alpha$  e IL-18 protege contra la toxicidad hepática. Ver, por ejemplo, Faggioni et al. (2000), PNAS 97: 2367-72.

IL-18 actúa *in vivo* a través de un sistema receptor que recuerda al sistema IL-1. IL-18 interactúa con un receptor de superficie celular (IL-18R), que interactúa con una proteína accesoria (IL-18RAcP). La señalización mediada por IL-18 continúa con la formación del complejo de IL-18, IL-18R e IL-18RAcP. Un inhibidor natural para IL-18 es IL-18bp. En ciertos aspectos de la presente divulgación, IL-18bp actúa como un "receptor señuelo" uniéndose a moléculas de IL-18 y evitando la interacción con IL-18R.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se divulgan terapias que comprenden un anticuerpo para OPGL y al menos un inhibidor de IL-18 y métodos de tratamiento que usan tales terapias. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una terapia comprende un anticuerpo para OPGL y un inhibidor de IL-18 y al menos una molécula adicional descrita en este documento. Las afecciones de ejemplo que pueden tratarse de acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, incluyen, pero no se limitan a, inflamación, enfermedades autoinmunes, enfermedades mediadas por IL-1 y enfermedades mediadas por TNF. Las afecciones de ejemplo que pueden tratarse con un anticuerpo para OPGL y al menos un inhibidor de IL-18 de acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, incluyen, pero no se limitan a, artritis, que incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); enfermedad de injerto contra huésped (GvHD); hepatitis; septicemia; y la pérdida de hueso y cartílago que acompaña a estas enfermedades.

Los ejemplos de inhibidores de IL-18 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos que se unen a IL-18; anticuerpos que se unen a IL-18R; anticuerpos que se unen a IL-18RAcP; IL-18bp; fragmentos de IL-18R (por ejemplo, un dominio extracelular solubilizado del receptor de IL-18); péptidos que se unen a IL-18 y reducen o evitan su interacción con IL-18R; péptidos que se unen a IL-18R y reducen o evitan su interacción con IL-18 o con IL-18RAcP, péptidos que se unen a IL-18RAcP y reducen o evitan su interacción con IL-18R; y moléculas pequeñas que reducen o previenen la producción de IL-18 o la interacción entre cualquiera de IL-18, IL-18R e IL-18RAcP.

Ciertos inhibidores de IL-18 se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 5,912,324, emitida Jul. 14, 1994; EP 0 962 531, publicado el 8 de diciembre 1999; EP 712 931, publicado el nov. 15, 1994; Pat. U.S. No. 5,914,253, emitida Jul. 14, 1994; WO 97/24441, publicado jul. 10, 1997; Pat. U.S. No. 6,060,283, expedida el 9 de mayo de 2000; EP 850 952, publicado el dic. 26, 1996; EP 864 585, publicado el Sep. 16, 1998; WO 98/41232, publicado el Sep. 24, 1998; Pat. U.S. No. 6,054,487, expedida abril 25, 2000; WO 99/09063, publicado agosto 14, 1997; WO 99/22760, publicado el nov. 3, 1997; WO 99/37772, publicado ene. 23, 1998; WO 99/37773, publicado en marzo 20, 1998; EP 0 974 600, publicado el ene. 26, 2000; WO 00/12555, publicado el Mar. 9, 2000; Solicitud de patente japonesa JP 111,399/94, publicada octubre 31, 1997; La solicitud de patente de Israel IL 121554 A0, publicada el 8 de febrero de 1998.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se puede usar un anticuerpo para OPGL con al menos un agente terapéutico para la inflamación. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se puede usar un anticuerpo para OPGL con al menos un agente terapéutico para un trastorno inmune. Los ejemplos de agentes terapéuticos para inflamación y trastornos inmunes incluyen, pero no se limitan a, corticosteroides, que incluyen, pero no se limitan a, prednisona; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), que incluyen, entre otros, inhibidores de ciclooxigenasa tipo 1 (COX-1) y ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2); fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), que incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, hidroxiclороquina, cloroquina, ciclosporina, compuestos de oro (tales como auranofina, aurotiomalato y aurotioglucosa) y leflunomida; Inhibidores de la fosfodiesterasa tipo IV, que incluyen, pero no se limitan a, Rolipram y Pentoxifilina; Tacrolimus (FK-506); Sirolimus (rapamicina); ácido micofenólico; Inhibidores de 5-lipoxigenasa, que incluyen, pero no se limitan a, Zileuton; moduladores de interleucina-6 (IL-6); moduladores de molécula pequeña de proteína quinasa activada por mitógeno de 38 kDa (p38-MAPK); moduladores de molécula pequeña de moléculas intracelulares implicadas en rutas de inflamación, en la que tales moléculas intracelulares incluyen, pero no se limitan a, jnk, IKK, NF- $\kappa$ B, ZAP70 e Ick. Se describen ciertos ejemplos de agentes terapéuticos para la inflamación, por ejemplo, en C.A. Dinarello and L.L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for

5 Clinicians Third Edition (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA. Determinados agentes terapéuticos de ejemplo para inflamación y enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, moduladores de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ); moduladores de OX40/OX40L (incluidas formas solubles de OX40); moduladores del ligando 4-1BB/4-1BB (incluyendo formas solubles de 4-1BB); y moduladores de rutas coestimuladoras de células B-T, que incluyen, pero no se limitan a, moduladores de los pares de ligandos del receptor CD28/B7, CD40/CD40L, ICOS/B7RP1 y AGP-3/TACI/BAFFR (AGP-3 se une a receptores TACI y BAFFR). Ciertos moduladores de ejemplo de las rutas coestimulantes de células B-T incluyen, entre otros, inhibidores de CD28, B7.1 y B7.2 (incluidas formas solubles de B7.1 o B7.2 y formas solubles de CTLA4, ambas de las cuales se puede fusionar a un péptido o proteína heterólogo que reduce o previene la degradación y/o aumenta la vida media, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad o aumenta la actividad biológica de una proteína terapéutica al aumentar la solubilidad o semivida circulante); inhibidores de CD40 y CD40L (que incluyen formas solubles de CD40 que pueden fusionarse a un péptido o proteína heteróloga); inhibidores de ICOS y B7RP1 (que incluyen formas solubles de ICOS que pueden fusionarse con un péptido o proteína heteróloga) e inhibidores de AGP-3, TACI y BAFFR (incluyendo formas solubles de TACI y BAFFR). ICOS, B7RP1 e inhibidores de los mismos se describen, por ejemplo, en WO00/46240. AGP-3, TACI y BAFFR e inhibidores de los mismos se describen, por ejemplo, en WO00/47740, WO01/85872, WO02/15273, WO98/39361, y von Bulow y Bram (1997) Science 278: 138-140.

10 En ciertos aspectos de la presente divulgación, se usa un anticuerpo para OPGL para tratar la pérdida ósea, que incluye, pero no se limita a, la pérdida ósea resultante de la destrucción osteolítica del hueso causada por tumores malignos o metastásicos. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL se puede usar para tratar la pérdida ósea asociada con el cáncer. Cánceres de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cánceres de mama, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, rectal, vejiga, cuello uterino, ovárico y hepático, así como cáncer del tracto gastrointestinal. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL se puede usar para tratar la pérdida ósea asociada con, por ejemplo, ciertas enfermedades malignas hematológicas, que incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple y linfoma, incluyendo la enfermedad de Hodgkin.

20 En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL se administra solo. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se administra un anticuerpo para OPGL con al menos otro agente terapéutico, que incluye, pero no se limita a, al menos otro agente de terapia contra el cáncer. Los ejemplos de agentes de terapia contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a, radioterapia y quimioterapia. En ciertos aspectos de la presente divulgación, la quimioterapia puede implicar el tratamiento con uno o más de los siguientes: antraciclina, taxol, tamoxifeno, doxorubicina, 5-fluorouracilo y otros fármacos conocidos en la técnica. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un agente de terapia del cáncer es un antagonista de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). En ciertos aspectos de la presente divulgación, un antagonista de LHRH es un antagonista peptídico.

25 En ciertos aspectos de la presente divulgación, un antagonista de LHRH comprende el péptido: Ac-D-Nal-4-CI-Phe-D-Pal-Ser-N-Me-Tyr-D-Asn-Leu-Lys (iPr)-Pro-D- Ala-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 20), en la que Nal es 3-(2-naftil)alaninilo; 4-CI-Phe es (4'-clorofenil) alaninilo; Pal es 3-(3'-piridil) alaninilo; y Lys (iPr) es N-epsilon-2-propil-lisinilo.

30 En ciertos aspectos de la presente divulgación, un antagonista de LHRH es un decapeptido antagonista de LHRH. Ciertos decapeptidos de ejemplo se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 5,843,901.

35 Los anticuerpos terapéuticos de ejemplo de acuerdo con ciertos aspectos incluyen, pero no se limitan a, ratón, anticuerpo quimérico de ratón, injertado con CDR, humanizado y completamente humano, y anticuerpos sintéticos, que incluyen, pero no se limitan a, los seleccionados mediante selección de bibliotecas de anticuerpos. Los anticuerpos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellos que se unen a las proteínas de superficie celular Her2, CDC20, CDC33, glucoproteína de tipo mucina y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presente en las células tumorales, y opcionalmente inducen un efecto citostático y/o citotóxico sobre las células tumorales que muestran estas proteínas. Los anticuerpos de ejemplo también incluyen HERCEPTIN™ (trastuzumab), que se puede usar para tratar el cáncer de mama y otras formas de cáncer, y RITUXAN™ (rituximab), ZEVALIN™ (ibritumomab tiuxetan) y LYMPHOCIDE™ (epratuzumab), que se puede usar para tratar el linfoma no Hodgkin y otras formas de cáncer. Ciertos anticuerpos de ejemplo también incluyen ERBITUX™ (IMC-C225), BEXXAR™ (yodo 131 tositumomab) y Campath.

40 En ciertos aspectos de la presente divulgación, los agentes de terapia del cáncer son polipéptidos que inducen selectivamente apoptosis en células tumorales, que incluyen, pero no se limitan a, el polipéptido TRAIL relacionado con TNF. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL se puede administrar al menos uno de antes, junto con, y posteriormente al tratamiento con un agente de terapia del cáncer. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL puede administrarse profilácticamente para prevenir o mitigar el inicio de la pérdida ósea por cáncer metastásico. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se puede administrar un anticuerpo a OPGL para el tratamiento de una afección existente de pérdida ósea debido a metástasis.

45 En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL puede usarse para prevenir y/o tratar la pérdida ósea asociada con el mieloma múltiple y/o para prevenir y/o tratar la enfermedad en sí misma. El mieloma múltiple es un tumor derivado de células B que puede producir una morbilidad y/o mortalidad significativa. En ciertos casos, una manifestación clínica de mieloma múltiple es la pérdida ósea focal, que puede deberse a una mayor activación de osteoclastos en regiones localizadas. Muchos pacientes con mieloma presentan lesiones óseas visibles por análisis radiológico y sufren de dolor esquelético. En ciertos casos, los pacientes con mieloma son susceptibles a las fracturas patológicas del hueso involucrado, que pueden ocurrir espontáneamente o debido a una lesión. En ciertos casos, las lesiones esqueléticas que ocurren durante el mieloma no solo provocan fracturas óseas, sino también deformidad y, ocasionalmente, compresión nerviosa, particularmente en la columna vertebral. En algunos pacientes, se produce un

aumento patológico en el calcio sérico (hipercalcemia) y puede causar problemas significativos durante el tratamiento de la enfermedad. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se puede administrar un anticuerpo para OPGL a pacientes para reducir o bloquear la resorción ósea y la liberación de calcio, lo que puede reducir el riesgo de fracturas y deformidad espinal.

5 En ciertos casos, las células de mieloma no participan directamente en la destrucción ósea, sino que producen señales extracelulares que conducen a la diferenciación y activación de los osteoclastos. En ciertos casos, los osteoclastos producen altos niveles de la citocina IL-6, particularmente cuando se activan. IL-6 es un factor de crecimiento de células B, y contribuye al crecimiento de células de mieloma murinas y humanas *in vitro*. Las células de mieloma también pueden producir OPGL directa o indirectamente, lo que puede dar como resultado la lisis ósea local que rodea las células de mieloma incrustadas en los espacios de la médula ósea. En ciertos casos, los osteoclastos normales adyacentes a la célula de mieloma a su vez producen IL-6, lo que puede conducir a la expansión local de las células tumorales. Las células de mieloma se expanden clonalmente y pueden ocupar espacios óseos creados por una resorción ósea inadecuada.

10 Se ha observado que la administración de OPG en roedores induce la muerte rápida de la población de osteoclastos (véase, por ejemplo, Lacey et al. (2000) *Am. J. Pathol.* 157:435-448). Una reducción en el número de osteoclastos puede contrarrestar el efecto del aumento de la producción de IL-6 por esas células y, por lo tanto, puede afectar el crecimiento y la supervivencia de las células de mieloma dentro del hueso trabecular. Por lo tanto, en ciertos aspectos de la presente divulgación, la administración de un anticuerpo a OPGL a un paciente con mieloma puede no solo bloquear la hiperresorción del hueso, sino también afectar la expansión y la supervivencia del tumor mismo.

15 Las células B expresan el receptor para OPGL, ODAR. Las células de mieloma también expresan ODAR, y además pueden producir OPGL. En ciertos casos, la expresión tanto de OPGL como de ODAR en la misma población celular puede crear un estímulo autocrino que afecta la supervivencia de la célula de mieloma. Por lo tanto, En ciertos aspectos de la presente divulgación, la administración de un anticuerpo a OPGL puede reducir la supervivencia de las células tumorales, disminuyendo o eliminando de ese modo la carga tumoral observada en pacientes con mieloma.

20 En ciertos aspectos divulgados en este documento, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo para OPGL junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

25 En ciertos aspectos divulgados en este documento, se proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo para OPGL y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, junto con un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En ciertos aspectos divulgados en este documento, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona de factores morfogénicos óseos designados BMP-1 a BMP-12; factor- $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) y miembros de la familia TGF- $\beta$ ; inhibidores de interleuquina-1 (IL-1), que incluyen, pero no se limitan a, IL-1ra y sus derivados y Kineret<sup>TM</sup>; Inhibidores de TNF $\alpha$ , que incluyen, pero no se limitan a, un receptor de TNF $\alpha$  soluble, Enbrel<sup>TM</sup>, anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , Remicade<sup>TM</sup> y anticuerpo D2E7; hormona paratiroidea y análogos de la misma, proteína relacionada con paratiroides y análogos de la misma; Prostaglandinas de la serie E; bisfosfonatos (tales como alendronato y otros); minerales que mejoran los huesos como fluoruro y calcio; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), que incluyen inhibidores de COX-2, tales como Celebrex<sup>TM</sup> y Vioxx<sup>TM</sup>; inmunosupresores, tales como metotrexato o leflunomida; inhibidores de serina proteasa tales como inhibidor de proteasa de leucocitos secretores (SLPI); Inhibidores de IL-6 (por ejemplo, anticuerpos para IL-6), inhibidores de IL-8 (por ejemplo, anticuerpos para IL-8); Inhibidores de IL-18 (por ejemplo, proteína de unión a IL-18 o anticuerpos de IL-18); Moduladores de la enzima convertidora de interleuquina-1 (ICE); modulares de los factores de crecimiento de fibroblastos FGF-1 a FGF-10 y FGF; Antagonistas de PAF; factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), moléculas relacionadas con KGF o moduladores de KGF; moduladores de metaloproteinasas de matriz (MMP); Moduladores de óxido nítrico sintasa (NOS), incluidos moduladores de NOS inducible; moduladores del receptor de glucocorticoides; moduladores del receptor de glutamato; moduladores de los niveles de lipopolisacáridos (LPS); y noradrenalina y moduladores y miméticos de los mismos.

30 En ciertos aspectos de la presente divulgación, los materiales de formulación aceptables preferiblemente no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

35 En ciertos aspectos divulgados en este documento, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En ciertos aspectos divulgados en este documento en este documento, los materiales de formulación adecuados incluyen, aunque sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos, monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes

- humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de entrega; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).
- 5 En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL y/o una molécula terapéutica está unido a un vehículo que se extiende en vida media conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 6660843 y la solicitud PCT publicada número WO 99/25044.
- 10 En ciertos aspectos de la presente divulgación, la composición farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la ruta de administración, el formato de administración y la dosificación deseados. Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, supra. En ciertos aspectos de la presente divulgación, tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo y la velocidad de eliminación in vivo de los anticuerpos de la presente divulgación.
- 15 En ciertos aspectos divulgados en la presente, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, en ciertos aspectos divulgados en el presente documento, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o fluido cerebroespinal artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral; solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son otros ejemplos de vehículos. En ciertos aspectos divulgados en el presente documento, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado para ello. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una composición que comprende un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede prepararse para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, supra) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en ciertos aspectos de la presente divulgación, una composición que comprende un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse como un liofilizado utilizando excipientes apropiados tales como sacarosa.
- 20 En ciertos aspectos divulgados en este documento, las composiciones farmacéuticas divulgadas y/o reivindicadas en este documento pueden seleccionarse para administración parenteral. En ciertos aspectos divulgados en la presente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de los conocimientos de la técnica.
- 25 En ciertos aspectos divulgados en el presente documento, los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En ciertos aspectos divulgados en la presente, los tampones se utilizan para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.
- 30 En ciertos aspectos de la presente divulgación, cuando se contempla la administración parenteral, una composición terapéutica puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable y libre de pirógenos que comprende el anticuerpo deseado para OPGL, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertos aspectos divulgados en el presente documento, un vehículo para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que el anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se formula como una solución isotónica estéril, conservada adecuadamente. En ciertos aspectos divulgados en este documento, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que puede proporcionar la liberación controlada o sostenida del producto que luego puede administrarse a través de una inyección de depósito. En ciertos aspectos divulgados en la presente, también se puede usar ácido hialurónico, y puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. En ciertos aspectos divulgados en este documento, los dispositivos de administración de fármacos implantables pueden usarse para introducir la molécula deseada.
- 35 En ciertos aspectos divulgados en el presente documento, una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se puede formular como un polvo seco para inhalación. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una solución de inhalación que comprende un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse con un propelente para la administración de aerosol. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las soluciones pueden nebulizarse. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud PCT publicada como WO 94/20069 A1 que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.
- 40 En ciertos aspectos de la presente divulgación, se contempla que las formulaciones pueden administrarse por vía oral. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que se administra de esta manera se puede formular con o sin los portadores utilizados habitualmente en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. En ciertos aspectos de la presente divulgación, una cápsula puede diseñarse para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tubo gastrointestinal cuando se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. En ciertos aspectos
- 45
- 50
- 55
- 60

de la presente divulgación, se puede incluir al menos un agente adicional para facilitar la absorción del anticuerpo a OPGL y/o a cualquier agente terapéutico adicional. En ciertos aspectos de la presente divulgación, también se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

5 En ciertos aspectos de la presente divulgación, una composición farmacéutica puede implicar una cantidad efectiva de anticuerpos contra OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. En ciertos aspectos de la presente divulgación, disolviendo los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado, las soluciones se pueden preparar en forma de dosis unitaria. En ciertos aspectos de la presente divulgación, los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

15 Las composiciones farmacéuticas adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican anticuerpos contra OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en formulaciones de administración sostenida o controlada. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito, también son conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT publicada como WO 93/15722 A1 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos US 3,773,919 y EP 058,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman wet al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli (2-hidroxietilmetacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etileno acetato de vinilo (Langer et al., *Supra*) o ácido poli-D (-) - 3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). En ciertos aspectos de la presente divulgación, las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 - 3692 (1985); EP 036,676; EP 088.046 y EP 143.949.

20 La composición farmacéutica que se va a utilizar para la administración in vivo típicamente es estéril. En ciertos aspectos divulgados en este documento, esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En ciertas realizaciones divulgadas y/o reivindicadas en el presente documento, cuando la composición se liofiliza, la esterilización utilizando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. En ciertos aspectos divulgados en este documento, la composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

30 En ciertos aspectos de la presente divulgación, una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, o como un polvo deshidratado o liofilizado; tales formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

40 En ciertos aspectos de la presente divulgación, se proporcionan kits para producir una unidad de administración de dosis única; cada uno de los kits puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se incluyen kits que contienen jeringas precargadas de una o varias cámaras (por ejemplo, jeringas líquidas y liojeringas).

45 En ciertos aspectos de la presente divulgación, la cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, para ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán por lo tanto dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la cual se utiliza el anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y/o condición (edad y estado general de salud) del paciente. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el médico puede valorar la dosificación y modificar la ruta de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. En ciertas realizaciones, una dosificación típica puede variar de aproximadamente 0.1 µg/kg a hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En ciertos aspectos de la presente divulgación, la dosificación puede variar de 0.1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.

55 En ciertos aspectos de la presente divulgación, la frecuencia de dosificación tendrá en cuenta los parámetros farmacocinéticos del anticuerpo para OPGL y/o cualquier agente terapéutico adicional en la formulación utilizada. En ciertos aspectos de la presente divulgación, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. En ciertos aspectos de la presente divulgación, la composición puede administrarse como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo o como una infusión continua. a través de un dispositivo de implantación o catéter. Los expertos en la técnica realizan rutinariamente un refinamiento adicional de la dosificación apropiada y están dentro del ámbito de las

tareas rutinariamente realizadas por ellos. En ciertos aspectos de la presente divulgación, se pueden determinar las dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de respuesta de dosis apropiados.

5 En ciertos aspectos de la presente divulgación, la ruta de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, v.g. por vía oral, mediante inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; por sistemas de liberación sostenida o por dispositivos de implantación. En ciertos aspectos de la presente divulgación, las composiciones se pueden administrar mediante inyección en bolo o continuamente mediante infusión, o mediante dispositivo de implantación.

10 En ciertos aspectos de la presente divulgación, la composición puede administrarse localmente mediante la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. En ciertos aspectos de la presente divulgación, cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede realizarse por difusión, administración en bolo de liberación temporizada o administración continua.

15 En ciertos aspectos de la presente divulgación, puede ser deseable usar una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, de una manera ex vivo. En tales casos, las células, tejidos y/u órganos que se han eliminado del paciente se exponen a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para OPGL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, después del cual las células, tejidos y/u órganos posteriormente se implantan de nuevo en el paciente.

20 Un anticuerpo para OPGL y/o cualquier agente terapéutico adicional se puede administrar implantando ciertas células que se han modificado genéticamente, utilizando métodos tales como los descritos en este documento, para expresar y secretar los polipéptidos. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Las células pueden inmortalizarse. Para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son típicamente cerramientos o membranas poliméricas semipermeables y biocompatibles que permiten la liberación de los productos proteínicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, que incluyen los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

### 30 Ejemplo 1

#### Clonación de cadenas pesadas y ligeras $\alpha$ OPGL-1

Las células CHO que expresan el ADNc de OPGL humano de longitud completa se utilizan para inmunizar ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humana. Los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados se fusionan a células de mieloma murinas para generar hibridomas. Los sobrenadantes de las líneas de hibridoma se prueban en un ensayo ELISA para anticuerpos que reaccionan con OPGL humano. Se encuentra que las líneas de hibridoma que expresan anti-OPGL AMG 6.5, AMG 6.4 y AMG 6.1 expresan anticuerpos con alta afinidad por OPGL (Kd de 0.28 nM, 0.29 nM y 0.23 nM, respectivamente), y AMG 6.5 se selecciona para clonación. Los clones de ADNc de cadena pesada y ligera de AMG 6.5 y AMG 6.4 son idénticos, y AMG 6.5 se utiliza para clonar el ADNc de cadena ligera  $\alpha$ OPGL-1, mientras que AMG 6.4 se utiliza para clonar el ADNc de cadena pesada  $\alpha$ OPGL-1.

#### 40 Clonación de la cadena ligera $\alpha$ OPGL-1

La región variable de la cadena ligera kappa  $\alpha$ OPGL-1 se obtiene utilizando métodos de amplificación por PCR a partir de ADNc de la primera cadena preparada a partir del ARN total de AMG 6.5. La primera cadena de ADNc se prepara a partir de ARN total de AMG 6.5 utilizando un cebador aleatorio con un adaptador 5' extendido (5'-GGCCGGATAGGCCTCACNNNNNT-3' (SEQ ID NO: 15)) y los materiales y métodos proporcionados por Gibco SuperScript II™ Preamplification System para el kit de síntesis First Strand cDNA Synthesis (Cat. No. 18089-011). Los oligonucleótidos a continuación se utilizan para la PCR:

cebador RACE kappa 5':

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

cebador RACE kappa 3':

50 5' - AAG GGT CAG AGG CCA AAG GAT GG - 3' (SEQ ID NO: 6)

Los ADN amplificados se clonan en pCRII-TOPO (Invitrogen) y los plásmidos resultantes se secuencian. La secuencia de consenso de la cadena kappa se utiliza para diseñar cebadores para la amplificación por PCR de la cadena kappa  $\alpha$ OPGL-1 de longitud completa. El cebador kappa  $\alpha$ OPGL-1 5' incorpora un sitio XbaI (TCTAGA) para la clonación y una secuencia Kozak "CCACC" antes del codón Met iniciador. El cebador kappa  $\alpha$ OPGL-1 3' incorpora un sitio Sall (GTCGAC) después del codón de parada para la clonación.

cebador kappa  $\alpha$ OPGL-1 5':

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

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

cebador kappa αOPGL-1 3':

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

5 Sitio Sall \* \* C E G R N F (SEQ ID NO: 17)

El clon de ADNc de la cadena kappa αOPGL-1 de longitud completa se obtiene utilizando el ADNc de la primera cadena AMG 6.5, descrito anteriormente, mediante amplificación por PCR con los cebadores kappa αOPGL-1 5' y 3'. La reacción de PCR genera un fragmento de 738 pb que codifica los 235 residuos de aminoácidos (que incluye la secuencia de señal de la cadena kappa de 20 aminoácidos) de la cadena kappa αOPGL-1 (Figura 4, SEQ ID NO: 4). Después de la purificación utilizando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen cat. No.28104), este fragmento se utiliza para construir el vector de expresión de la cadena ligera kappa.

El fragmento kappa de longitud completa de 738 pb generado anteriormente se corta con XbaI y Sall, se purifica utilizando el sistema de limpieza de ADN Promega Wizard (Promega, nº de catálogo A7100) y se clona en pDSRα19 para generar plásmido. αOPGL-1- kappa/pDSRα19 (Figura 5). El pDSRα19 se ha descrito anteriormente (véase el documento WO 90/14363, que se incorpora aquí como referencia para cualquier propósito (véase, por ejemplo, la Figura 12)). Brevemente, para hacer pDSRα19, pDSRα2 se modifica de las siguientes maneras: el FSH poliA se acorta en aproximadamente 1400 pares de bases, a 885 pares de bases, y ahora termina en el sitio NdeI; el promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR) ahora contiene 209 pares de bases, habiéndose acortado del extremo 5' en aproximadamente 1 kilobase; y se elimina un fragmento BglII de aproximadamente 550 pares de bases de la secuencia DHFR poliA.

El clon de expresión de cadena ligera kappa αOPGL-1 se secuencia para confirmar que codifica para el mismo péptido que se identifica en el hibridoma AMG 6.5. El vector de expresión final, αOPGL-1-kappa/pDSRα19, tiene 5476 pb y contiene las 7 regiones funcionales que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Características del αOPGL-1-kappa/pDSRα19

Número del par de bases del plásmido: 2 a 881	Una señal de terminación de transcripción/poliadenilación de la subunidad de la hormona glicoproteica de la hipófisis bovina (α-FSH) (Goodwin, et al, Nucleic Acids Res. 1983 11: 6873-82; Número de acceso Genbank X00004)
882 a 2027	Un minigen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón que contiene el promotor de DHFR de ratón endógeno, las secuencias codificantes de ADNc, y las señales de polimerización/terminación de la transcripción de DHFR (Gasser y col., Proc Natl Acad Sci US A. 1982 79: 6522-6; Nunberg et al., Cell 1980 19: 355 - 64; Setzer et al, J Biol Chem. 1982 257: 5143 - 7; McGrogan y col., J Biol Chem. 1985 260: 2307 - 14)
2031 a 3947	secuencias pBR322 que contienen el gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de la replicación del plásmido en E. coli (número de acceso Genbank J01749)
3949 a 4292	Un promotor SV40 temprano, potenciador y origen de replicación (Takebe et al, Mol Cell Biol. 1988 8: 466-72., Número de acceso de Genbank J02400)
4299 a 4565	Un elemento potenciador de la traducción del dominio HTLV-1 LTR (Seiki y col., Proc Natl Acad Sci US A. 1983 80: 3618-22, número de acceso Genbank J02029)
4574 a 4730	Un intrón a partir de las señales donante/aceptora de empalme SVS 16S, 19S (Okayama y Berg, Mol Cell Biol. 1983 3: 280-9, número de acceso Genbank J02400)
4750 a 5476	El ADNc de la cadena ligera Kappa αOPGL-1 entre los sitios XbaI y Sall

25

Se muestra un mapa de plásmido circular del vector en la Figura 5.

Clonación de la cadena pesada αOPGL-1.

La cadena pesada de IgG2 de αOPGL-1 se clona a partir de ADNc de doble cadena de hibridoma AMG 6.4 producido con el kit de amplificación de ADNc de Clontech Marathon™ (No. de catálogo K1802-1). La amplificación del ADNc de la cadena pesada AMG 6.4 se realiza por técnicas de amplificación rápida 5' y 3' de extremos de ADNc (RACE) realizadas con cebadores específicos de la región constante de la cadena pesada IgG2 humana de la estirpe germinal (mostrados a continuación) y cebadores RACE y otros materiales y métodos proporcionados en el Kit de amplificación de cDNA Marathon™.

cebador RACE IgG2 5'

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

cebador RACE IgG2 3'

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

El producto RACE 5' de 600 pb y el producto RACE 3' de 1200 pb se clonan en pCR2.1 (Invitrogen) y se secuencian. Esta información de secuencia se utiliza para diseñar cebadores específicos de cadena pesada  $\alpha$ OPGL-1 para la clonación de la secuencia de longitud completa. El cebador 5' de cadena pesada (cebador IgG2  $\alpha$ OPGL-1 5') se dirige contra la cadena sentido y tiene un sitio HindIII y una secuencia Kozak de consenso antes del sitio de inicio natural. El cebador 3' de la cadena pesada (cebador 3'  $\alpha$ OPGL-1 IgG2) es un cebador antisentido que contiene un sitio Sall y un codón de detención después del último aminoácido de la secuencia de IgG2 de la cadena pesada.

cebador IgG2  $\alpha$ OPGL-1 5':

10 5'- CAGAAGCTTGACCACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GC - 3' (SEQ ID NO: 11)

*HindIII*Kozak M E F G L S W L F L V A (SEQ ID NO: 18)

cebador IgG2 3'  $\alpha$ OPGL-1:

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

*Sall* \*\* K G P S L S L (SEQ ID NO: 19)

15 El ADNc de doble cadena descrito anteriormente se utiliza para generar el ADNc de la cadena pesada de longitud completa mediante amplificación por PCR con los cebadores IgG2  $\alpha$ OPGL-1 5' y 3'. La PCR genera un fragmento de 1433 pb que codifica los 467 residuos de aminoácidos (que incluye la secuencia de señal de IgG de 19 aminoácidos) de la proteína de cadena pesada de IgG2  $\alpha$ OPGL-1 (Figura 2, SEQ ID NO: 2). Después de la purificación utilizando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen cat. No.28104), este fragmento se utiliza para construir el vector de expresión de la cadena pesada de la siguiente manera.

20 El ADN que codifica el fragmento pesado IgG2 de longitud completa generado anteriormente se corta con HindIII y Sall, se purifica utilizando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen cat. No. 8704), y este fragmento se clona en pDSR $\alpha$ 19. El plásmido de expresión resultante se denomina  $\alpha$ OPGL-1-IgG2/pDSR $\alpha$ 19 (Figura 6). Todos los componentes del vector son idénticos al vector kappa  $\alpha$ OPGL-1/pDSR $\alpha$ 19, descrito anteriormente, excepto que el ADNc de la cadena pesada IgG2  $\alpha$ OPGL-1 reemplaza el ADNc de la cadena ligera kappa  $\alpha$ OPGL-1 entre los sitios XbaI y Sall. El clon de expresión de la cadena pesada IgG2 de  $\alpha$ OPGL-1 se secuencian para confirmar que codifica para el mismo polipéptido que se identifica en el hibridoma AMG 6.4.

Ejemplo 2

Expresión  $\alpha$ OPGL-1 en células CHO

30 La expresión estable del anticuerpo  $\alpha$ OPGL-1 se consigue mediante co-transfección de plásmidos kappa  $\alpha$ OPGL-1/pDSR $\alpha$ 19 y  $\alpha$ OPGL-1-IgG2/pDSR $\alpha$ 19 en células de ovario de hámster chino (CHO AM-1/D, Patente de Estados Unidos No. 6,210,924) deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) seguido de aislamiento y prueba de clones individuales.

35 Una placa de cultivo tisular de 100 mm se coloca en placas con  $1.5 \times 10^6$  células AM-1/D cultivadas en medio d' CHO (glucosa rica en DMEM, suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomocina/glutamina al 1%, NaPyruvate 1X, aminoácidos no esenciales al 1% (NEAA) (Gibco®) y suplemento de ht al 1% (Gibco®)) el día antes de las transfecciones (Día 0). El día uno, se dividen en alícuotas de 400  $\mu$ l de medio RPMI 1640 libre de suero (Gibco®) en un tubo de polipropileno de 12x75 mm. Se añaden veinticuatro microlitros de reactivo TransIT@-LT1 (Mirus Corporation) gota a gota al medio y la mezcla se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añaden gota a gota a la mezcla un total de 15  $\mu$ g de ADN de plásmido linealizado (7.5  $\mu$ g de kappa  $\alpha$ OPGL-1/pDSR $\alpha$ 19 y 7.5  $\mu$ g de  $\alpha$ OPGL-1-IgG2/pDSR $\alpha$ 19, digerido con Pvu1) se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos.

40 El medio d' CHO se elimina de las células, que se lavan con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Gibco®). Se añaden a las células seis mililitros de medio MEM sin suero suplementado con HT, L-glu, NEAA y piruvato de Na (Gibco®). El complejo ADN/LT1 se agrega gota a gota a las placas, que se balancean suavemente hacia adelante y hacia atrás para distribuir el ADN de manera uniforme sobre las células. Después de 6 horas en una incubadora de cultivo tisular, el medio se reemplaza con medio d' CHO fresco. Cuarenta y ocho horas después, las células se dividen en diez platos de cultivo de 100 mm en medio seleccionado CHO (DMEM rico en glucosa, suero fetal bovino dializado al 10% (FBS), penicilina/estreptomocina/glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y piruvato de Na 1X) (Gibco®). El medio se cambia dos veces por semana hasta que aparecieron las colonias.

45 Después de 10-14 días, las colonias se recogen utilizando discos de clonación de 5 mm (Labcore®) empapados en 1x tripsina-EDTA (Gibco®) y se cultivan en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos con medio CHO seleccionado. Cuando las células se vuelven confluentes, se agrega medio libre de suero (medio de selección de CHO menos FBS) y luego se recoge 48 horas después. Estos medios condicionados se analizan para determinar la expresión del anticuerpo mediante Western blot con anticuerpo Fc IgG antihumano de cabra conjugado (HRP) con peroxidasa de rábano silvestre (Pierce, Rockford, IL) para detectar la cadena pesada  $\alpha$ OPGL-1 y el anticuerpo de cadena kappa antihumano de cabra (Pierce, Rockford, IL) seguido por anticuerpo de IgG (H + L) anti-cabra de conejo conjugado con HRP (Pierce, Rockford, IL) para detectar la cadena ligera  $\alpha$ OPGL-1. Los clones de expresión más alta se expanden y almacenan en nitrógeno líquido.

Ejemplo 3

Producción de  $\alpha$ OPGL-1

Preparación y creación de estirpe celular 125Q

5 Las células CHO que producen  $\alpha$ OPGL-1 se clonan mediante dos rondas de dilución limitante en placas de 96 pozos en condiciones sin suero. Los clones se seleccionan basándose en las características de producción y crecimiento en diversos recipientes de suspensión. Los EIA se realizan para seleccionar el clon que produce el nivel más alto de  $\alpha$ OPGL-1. Las características de crecimiento, que incluyen tiempos y densidades de duplicado, se miden luego cultivando los clones en matraces con agitación de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L y 3 L, así como en los biorreactores Applikon de 3 L. Se selecciona el clon con el tiempo de duplicación más rápido que alcanza la densidad más alta en cultivo, y se denomina Cell Line 125Q. Cuando el clon se ha expandido para producir células suficientes para congelar 360 ampollas a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml, las células se resuspenden en un medio crioconservador exento de suero (90% VM-Soy Batch Medium (ver Tabla 3 para detalles) complementado con 10 ml/L aminoácidos no esenciales y 10 ml/L L-Glutamina (Gibco/LTI/Invitrogen), y dimetilsulfóxido al 10% (JT Baker)) y se congelan. Las ampollas se almacenan en una instalación de acceso limitado y se sumergen en nitrógeno líquido en botellas aislantes de nitrógeno líquido.

10

15 De acuerdo con el crecimiento y la producción en hilanderos de pequeña escala y biorreactores de mayor escala, se elige la estirpe celular 125Q como la estirpe celular para la fabricación de  $\alpha$ OPGL-1.

Cultivo celular

$\alpha$ OPGL-1 se produce por expresión en la estirpe celular 125Q, una estirpe clonal de células CHO que expresa  $\alpha$ OPGL-1 de los plásmidos  $\kappa$  $\alpha$ OPGL-1/pDSR $\alpha$ 19 y  $\alpha$ OPGL-1-IgG2/pDSR $\alpha$  19. El proceso de cultivo celular para  $\alpha$ OPGL-1 se muestra en la Figura 19. Para cada serie de producción, las células de un vial de Cell Line 125Q se cultivan inicialmente en 50 ml de medio VM-Soy Batch (ver Tabla 3 para composición) complementado con 10 ml/L de aminoácidos no esenciales y 10 ml/L de L-glutamina (Gibco/LTI/Invitrogen) (VM-Soy Supp) en matraz de agitación de 125 ml a 100 rpm durante 5 días. El cultivo completo se utiliza luego para inocular VM-Soy Supp en un matraz agitación de 500 ml a  $3 \times 10^5$  células viables/ml ( $3E5$  vc/ml) y se cultiva con 70 rpm de hilado durante 3-4 días. El cultivo completo del matraz de agitación de 500 ml se utiliza luego para inocular VM-Soy Supp en un matraz de agitación de 3 l a  $3E5$  vc/ml, y se cultiva con 70 rpm de hilado durante 3-4 días.

20

25

El cultivo del matraz de agitación de 3 l se divide luego en dos matraces de agitación de 3 l a  $3E5$  vc/ml en VM-Soy Supp sin rojo de fenol y se cultiva en las mismas condiciones. Estos cultivos de matraces giratorios se utilizan luego para inocular cuatro matraces agitadores adicionales a  $3E5$  vc/ml en VM-Soy Supp sin rojo de fenol, y se cultivan en las mismas condiciones. Se utilizan cuatro litros de cultivo de los cuatro matraces con agitador 3L para inocular 10 L de VM-Soy Supp sin rojo de fenol en un biorreactor de 20 L, y el biorreactor se procesa en modo alimentado por lotes durante 7-10 días. En el modo por lotes alimentados, se añade una alimentación de nutrientes que contiene componentes de medios concentrados ("alimentación", como se expone a continuación en la Tabla 3) para mantener el crecimiento celular y la viabilidad del cultivo.

30

El cultivo completo del biorreactor 20L se utiliza entonces para inocular 70 l de VM-Soy Supp sin rojo de fenol en un biorreactor de 150 l, y el biorreactor se procesa en modo alimentado por lotes durante 9-10 días. Finalmente, todo el cultivo del biorreactor 150L se utiliza para inocular aproximadamente 880 L de VM-Soy (sin suplemento o rojo fenol) en un biorreactor 2000L, y el biorreactor se procesa en modo tanda de alimentación. La velocidad de alimentación durante el modo de alimentación por lotes se determina de modo que el nivel de glucosa en el cultivo se mantenga a 0.6 g/l para cada biorreactor. La densidad celular y la concentración de glucosa se miden a diario y la velocidad de alimentación se ajusta en consecuencia.

35

40

La producción en el biorreactor 2000L dura aproximadamente dos semanas durante cuyo tiempo  $\alpha$ OPGL-1 se produce constitutivamente por las células y se secreta en el medio de cultivo celular.

El reactor de producción se controla a un pH, temperatura y nivel de oxígeno disuelto establecidos: el pH es 7.0 y está controlado por dióxido de carbono gaseoso y adición de carbonato de sodio; el oxígeno disuelto es de 120 mmHg y está controlado por los flujos de aire, nitrógeno y gas oxígeno. Las células se mantienen a 37 °C durante todo el proceso. Todos los gases se pasan a través de filtros de membrana con un tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m o menos.

45

Al final de la producción, el caldo de células se alimenta a una centrifuga de pila de discos y el sobrenadante de cultivo se separa de las células. El centrifugado se clarifica adicionalmente a través de un filtro de profundidad Cuno 90SP seguido de un filtro Posidyne de 0.2  $\mu$ m (Pall Co.). El medio acondicionado clarificado se concentra a continuación mediante ultrafiltración de flujo tangencial (UF) utilizando membranas de 50 kD NMWL (Millipore Biomax 50). El medio acondicionado se concentra de 15 a 30 veces. El medio acondicionado concentrado resultante (CCM) se procesa a continuación mediante purificación o se congela para la purificación en una fecha posterior. El proceso de producción se resume en la Figura 19.

50

Medio de cultivo celular

El medio de cultivo celular para uso en todo el proceso de cultivo celular se basa en el Medio Eagle modificado de Dulbecco/Nutriente de Ham F12 (DMEM/F12, 1:1), y contiene niveles suplementarios de aminoácidos, nutrientes adicionales y sales, un hidrolizado de soja e insulina humana recombinante (Nucellin@Zn, Eli Lilly). Los componentes se

## ES 2 675 735 T3

enumeran en la Tabla 3. Este medio se conoce como VM-Soy. Las soluciones de medios se filtran a través de filtros de membrana de 0.2 µm de tamaño de poro antes del uso.

Tabla 3. Componentes del medio de cultivo celular

COMPONENTES PARA MEDIOS BÁSICOS y ALIMENTOS		
COMPONENTE	Medio de tanda VMSoy (mg/l)	ALIMENTOS (mg/l)
COMPONENTES DMEM/F12		
CaCl <sub>2</sub> (anhíd.)	116.60	233.2
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0026	0.0052
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0.1000	0.2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.8340	1.668
KCl	311.80	623.6
MgCl <sub>2</sub> (anhíd.)	57.280	114.56
MgSO <sub>4</sub> (anhíd.)	97.680	195.36
NaCl	905.990	1811.98
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	125.00	250
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142.040	284.08
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.8640	1.728
Otros Componentes		
D-Glucosa	3151.00	12302
Hipoxantina Na	5.40	10.8
Ácido Linoleico	0.090	0.18
Ácido Lipoico	0.2060	0.412
Rojo Fenol	8.10	16.2
Putrescina.2HCl	0.1620	0.324
Piruvato de Sodio	110.00	220
Aminoácidos		
L-Alanina	26.70	53.4
L-Arginina HCl	295.00	590
L-Asparagina.H <sub>2</sub> O	45.00	90
Ácido L-Aspártico	39.90	79.8
L-Cisteína.HCl.H <sub>2</sub> O	35.120	70.24
Sales inorgánicas		
L-Cistina.2HCl	62.580	125.16
Ácido L-Glutámico	44.10	88.2
L-Glutamina	657.00	1314
Glicina	52.50	105
L-Histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	62.950	125.9
L-Isoleucina	108.940	217.88
L-Leucina	118.10	236.2
L-LisinaHCl	182.50	365

ES 2 675 735 T3

L-Metionina	34.480	68.96
L-Fenilalanina	70.960	141.92
L-Prolina	57.50	115
L-Serina	73.50	147
L-Treonina	106.90	213.8
L-Triptofano	18.040	36.08
L-Tirosina.2Na.2H2O	111.580	223.16
L-Valina	105.70	211.4
Vitaminas		
Biotina	0.0073	0.0146
Pantotenato D-Ca	4.480	8.96
Cloruro de Colina	17.960	35.92
Ácido Fólico	5.30	10.6
i-Inositol	25.20	50.4
Niacinamida	4.040	8.08
Piridoxal HCl	4.00	8
Piridoxina HCl	0.0620	0.124
Riboflavina	0.4380	0.876
TiamineHCl	4.340	8.68
Timidina	0.3635	0.727
VitaminaB12	1.360	2.72
COMPONENTES ADICIONALES		
Nucellina Zn, (insulina rhu)	5.00	15
Ácido Selénico	0.0050	0.015
Etanolamina	0.0012	0.0037
Triyodotironina	0.000040	0.00012
Hidrocortisona	0.020	0.06
Citrato Férrico	122.450	122.450
F-68 Plurónico	1000.00	500
Hidrolisato de Soya	6000.00	6000.00
NaHCO3	3000.00	3000.00
NaCl	3500.00	

Proceso de purificación

La  $\alpha$ OPGL-1 expresada en células CHO se secreta en el medio extracelular. Se pueden usar una serie de etapas para generar material puro. El proceso utiliza inducción de carga hidrófoba, intercambio catiónico y cromatografía de interacción hidrófoba junto con una etapa de pH bajo y un filtro viral. Estos procedimientos se describen a continuación.

A. Cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC)

Esta etapa de cromatografía elimina la mayoría de las proteínas de la célula huésped y el ADN. El medio acondicionado concentrado (CCM) se filtra a través de un filtro Cuno 30SP y luego a través de un filtro basado en celulosa cargado con Cuno VR07, y luego se carga en una resina MEP HyperCel. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado (Tris 20 mM, pH 7.2). El anticuerpo se eluye de la resina utilizando un tampón de pH bajo (acetato de sodio

20 mM, pH 5.0). A medida que se eluye de la columna, el producto se recoge en base a la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna.

B. Inactivación viral

5 El conjunto de MEP se titula a pH 3,7 y se mantiene durante aproximadamente 60 minutos para inactivar un retrovirus potencialmente contaminante. Después de la etapa de espera, el pH se ajusta a aproximadamente 6.0.

C. Filtración viral

El conjunto ajustado al pH se filtra a través de un filtro Millipore Viresolve NFR o equivalente. El anticuerpo fluye a través del filtro mientras se conservan los virus potencialmente contaminantes  $\geq 50$  nm.

D. Cromatografía de intercambio de cationes (CEX)

10 El anticuerpo se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando SP Sepharose HP (Amersham Pharmacia) o equivalente. La etapa de cromatografía de intercambio catiónico elimina proteínas de células CHO adicionales, ADN, proteínas de menor peso molecular y formas agregadas de  $\alpha$ OPGL-1. El conjunto filtrado viral se carga en la resina de intercambio catiónico. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado (NaMES 20 mM, pH 6.2). El anticuerpo luego se eluye con un gradiente lineal de sal creciente (NaMES 20 mM pH 6.2, NaCl 0 M a 15 NaMES 20 mM pH 6.2, NaCl 0.3 M). A medida que se eluye de la columna, el producto se recoge en base a la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna.

E. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

20 El anticuerpo se purifica adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba utilizando Fenil Toyopearl 650S (Tosoh Biosep) o equivalente. La etapa de cromatografía de interacción hidrófoba se utiliza como una etapa de pulido y elimina proteínas adicionales de células CHO, ADN, proteínas de menor peso molecular y formas agregadas de  $\alpha$ OPGL-1. El conjunto de intercambio catiónico se acondiciona antes de cargarlo en la columna mediante la adición de sulfato de amonio a una conductividad de  $> 105$  mS/cm a 15-25 °C. Después de la carga, la columna se lava con el tampón de equilibrado (fosfato potásico 1M, pH 8). El anticuerpo se eluye a continuación con un gradiente lineal de concentración de sal decreciente (fosfato de potasio 1M, Tris 0 mM pH 8 a fosfato potásico 0M, Tris 20 mM pH 8). A medida que se eluye de la columna, el producto se recoge en base a la absorbancia a 280 nm del efluente de la columna. F.

Concentración y Diafiltración

El conjunto de columnas de HIC se concentra y diafiltra en tampón de formulación mediante ultrafiltración de flujo tangencial utilizando membranas de 50 kD NMWL (Millipore Biomax 50). El tampón de formulación incluye acetato 10 mM, sorbitol al 5%, pH 5.2 y  $\alpha$ OPGL-1 a 30 mg/ml.

30 Filtración final y almacenamiento

El volumen purificado se pasa a través de un filtro PVDF de 0,22  $\mu$ m (Millipore), se muestrea y almacena a aproximadamente -30 °C en un congelador asegurado.

Ejemplo 4

Especificidad de unión de  $\alpha$ OPGL-1

35 Los anticuerpos que se producen en células CHO que se transfectan con los dos vectores de expresión como se discutió en los Ejemplos 1 y 2 se pueden usar en los siguientes ejemplos 4, 5 y 6.

La OPG humana se une y neutraliza OPGL en ratas, ratones y monos cynomolgus, así como en humanos.  $\alpha$ OPGL-1 se une a OPGL humano con alta afinidad, pero no se une significativamente a OPGL de murino (Tabla 4).

40 Tabla 4: Afinidad de  $\alpha$ OPGL-1 a OPGL expresado en membrana celular en Secuencia de humanos, mono Cynomolgus o Ratón.

Especies OPGL	ED <sub>50</sub> de $\alpha$ OPGL-1 (ng/ml)
Humano	16
Cynomolgus	19
Ratón	Unión no específica

OPGL de estas especies se expresa en células CHO como la proteína de longitud completa, unida a la membrana. La unión de  $\alpha$ OPGL-1 a la superficie celular expresada OPGL se evalúa mediante análisis FACS de células incubadas con  $\alpha$ OPGL-1 y un anticuerpo secundario marcado con FITC para IgG2 humana.  $\alpha$ OPGL-1 se une a OPGL humano y Cynomolgus, pero no hay unión específica a OPGL de ratón.

Además, se ha informado que OPG humana muestra unión débil al ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) (Truneh et al, 2000), un miembro relacionado de la familia de TNF, que muestra ADN y aminoácido. homología de secuencia con OPGL (Lacey et al., 1998). Sin embargo, OPG no se une de manera detectable a otras proteínas relacionadas con TNF tales como ligando TNF $\alpha$  TNF $\beta$  o CD40.

5  $\alpha$ OPGL-1 se une específicamente a OPGL en placas de EIA (Figura 7). El OPGL soluble recombinante (2  $\mu$ g/ml) se recubre sobre placas de EIA de 96 pozos a temperatura ambiente durante 16 a 24 horas. Después de bloquear con BSA al 1% en PBS, se añaden concentraciones variables de  $\alpha$ OPGL-1 (aproximadamente 2 ng/ml a 1000 ng/ml) diluidas en BSA/PBS al 1% a los pozos y las placas se incuban durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detecta con IgG de cabra anti-humana (Fab') - HRP utilizando el cóctel de sustrato de TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno). La absorbancia se lee a 450 nm y 650 nm.

10  $\alpha$ OPGL-1 se une específicamente a OPGL expresado en la superficie de las células transfectadas (Figura 8). Se preincubó  $\alpha$ OPGL-1 (100 ng/ml) diluido en tampón FACS (PBS, BSA al 0.1%, azida sódica al 0.01%) con concentraciones variables de ligando OPGL, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TRAIL o CD40 (aproximadamente 0.1 ng/ml a 1000 ng/ml), y luego se agrega a aproximadamente 200,000 células CHO REN 218-9, que son células CHO que expresan establemente OPGL unido a membrana en la superficie celular. Después de 1 hora a 2-8 °C, el anticuerpo no unido se elimina por centrifugación y lavado. Después, las células se incuban durante 30 minutos a 2-8 °C con F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG humana de cabra marcada con FITC (Fcy específico del fragmento). Después de la centrifugación y el lavado, la fluorescencia de la superficie celular se mide utilizando citometría de flujo. La Figura 8 muestra que la unión de  $\alpha$ OPGL-1 a células CHO REN 218-9 es específica, y se reduce competitivamente mediante la adición de OPGL soluble, pero no mediante la adición del ligando TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TRAIL o CD40.

20 En experimentos de competición, la unión de  $\alpha$ OPGL-1 a OPGL en placas de EIA se inhibe mediante la adición de OPGL exógeno (Figura 9), pero no mediante la adición de ligando TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TRAIL o CD40 (Figura 10). Este procedimiento se realiza sustancialmente de la misma manera que anteriormente, para la unión de  $\alpha$ OPGL-1 a OPGL en placas de EIA, excepto que se preincubó una concentración constante de  $\alpha$ OPGL-1 (100 ng/ml) con concentraciones variables de OPGL soluble u otros ligandos (aproximadamente 1 ng/ml a 1000 ng/ml para cada uno) antes de que se agregue a las placas recubiertas con OPGL.

#### Ejemplo 5

##### Actividad neutralizante NeuOPGL-1

##### Inhibición de la formación de osteoclastos

30 El RAW 264.7 (ATCC No. TIB-71, Manassas, VA) es una estirpe celular de macrófagos murinos que se derivó de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina Abelson. Las células RAW 264.7 se diferenciarán a células similares a osteoclastos en presencia de OPGL. El ensayo básico para la generación de osteoclastos en cultivo a partir de células RAW en presencia de OPGL ha sido descrito en detalle en Simonet et al (1997) Cell 89 p. 309, y Lacey et al (1998) Cell 93 p. 165.

35 Las células RAW son estimuladas por ligando para diferenciarse en células similares a osteoclastos, y la diferenciación puede ser medida por la actividad TRAP, una propiedad de los osteoclastos. Por lo tanto, se puede medir el efecto de  $\alpha$ OPGL-1 sobre la osteoclastogénesis

40 Las células RAW se introducen durante 4 días en la presencia de una cantidad constante de OPGL (40 ng/ml) y cantidades variables de  $\alpha$ OPGL-1 (6.3 ng/ml a 200 ng/ml) en medio de cultivo celular (DMEM, FBS al 10%, 0.292 mg/ml de L-Glut, 100 unidades/ml de Penicilina G, 100 mg/ml de Sulfato de estreptomycin). Al final de 4 días, las células se tiñen para detectar actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) mediante permeabilización y acidificación, seguido por tratamiento con para-nitrofenilfosfato durante 5 minutos. Brevemente, los medios se aspiran fuera de las células y se agregan 100  $\mu$ l de tampón de citrato (410 ml de ácido cítrico 0.1 M, 590 ml de citrato 0.1 M, sal trisódica, 1 mL de tritón X-100) a cada pozo y las placas se incuban durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregan cien microlitros de solución de PNPP (157.8 mg de reactivo de fosfatasa ácida (Sigma 104-100), 7.2 ml de solución de tartrato (Sigma cat. No. 387-3) y 22.8 ml de tampón de citrato), y las placas se incuban durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de 50  $\mu$ l de solución de NaOH 0.5 M.

45 TRAP convertirá el para-nitrofenilfosfato a para-nitrofenol, que se puede cuantificar mediante medición de densidad óptica a 405 nm. La actividad TRAP, que es un marcador sustituto para el desarrollo de osteoclastos, por lo tanto, se correlaciona con la densidad óptica a 405 nm. En la Figura 11 se muestra un gráfico de densidad óptica frente a la concentración de  $\alpha$ OPGL-1, y se demuestra que el  $\alpha$ OPGL-1 inhibe la formación de osteoclastos en este ensayo.

##### Inhibición de la unión de OPGL a su receptor

55 La potencia de  $\alpha$ OPGL-1 se demuestra por su capacidad para bloquear la unión del ligando de OPG a su receptor afín, la diferenciación de osteoclastos y el receptor de activación (ODAR, también conocido como RANK). Este ensayo utiliza resonancia fluorescente resuelta en el tiempo homogénea (HTRF) para detectar la unión de  $\alpha$ OPGL-1 a ligando de osteoprotegerina conjugado con europio (Eu-OPGL). Si  $\alpha$ OPGL-1 inhibe la unión de Eu-OPGL a ODAR, disminuirá la producción de fluorescencia, y la cantidad de  $\alpha$ OPGL-1 presente estará inversamente relacionada con la cantidad de fluorescencia.

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

Se preincubó Eu-OPGL a 0.05 µg/ml con diversas concentraciones (0.1 a 150 ng/ml) de αOPGL-1 en tampón de ensayo (Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, NaN<sub>3</sub> al 0.05%, BSA al 0.1%, y Tween 20 al 0.05%) a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora (mezcla de preincubación). También se prepara una mezcla de Fc-ODAR-FLAG (1 µg/ml) y anti-FLAG-APC (2.5 µg/ml) en tampón de ensayo y se incuba a temperatura ambiente durante una hora (mezcla de fluorocromo). Luego se combinan volúmenes iguales de la mezcla de preincubación y la mezcla de fluorocromo y se incuban a temperatura ambiente durante 3 horas. La fluorescencia se mide al leer las placas en el analizador de microplacas de Packard Discovery HTRF utilizando una longitud de onda de excitación de 337 nm y una longitud de onda de emisión de 665 nm.

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

Ejemplo 6 Farmacocinética en monos Cynomolgus

Se asignan seis monos Cynomolgus machos y seis hembras, no mayores de 4.5 años de edad y con un peso de 2 a 4 kg a grupos de 4 dosis. El grupo 1 consiste de 3 machos y 3 hembras. Los grupos 2, 3 y 4 cada uno consiste de 1 macho y 1 hembra. A los animales del Grupo 1 se les administra una única dosis SC de 1 mg/kg de αOPGL-1, mientras que a los animales de los grupos 2, 3 y 4 se les administran dosis individuales IV de 0.1, 1.0 o 10.0 mg/kg de αOPGL-1, respectivamente.

Los animales se dosifican con αOPGL-1 expresado a partir de células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas. Se toman muestras de suero para la determinación de los niveles de αOPGL-1, el análisis de anticuerpos y el análisis del marcador de telopéptido N en suero de renovación ósea (suero N-Tx), fosfatasa alcalina (ALP) y calcio en suero (Ca en suero). La orina también se recoge para el análisis de N-telopéptido (orina N-Tx) y creatinina.

Los perfiles de concentración en suero-tiempo después de la administración IV se caracterizan por una distribución trifásica (Figura 13). Inicialmente, existe una fase de distribución rápida, seguida de una fase de meseta significativamente más lenta, que parece depender de la concentración. La tercera fase observada es una fase de eliminación rápida.

Análisis no compartimental de perfiles completos de concentración de suero-tiempo utilizando WinNonlin Professional (v1.5), y análisis exponencial de los datos hasta 14 días después de la administración del artículo de prueba y por encima de 10.000 ng/mL utilizando SAAM II (v1.1.2) se utilizan para investigar la farmacocinética de αOPGL-1 en monos. El volumen inicial de distribución de todas las dosis intravenosas promedia 28.9 ml/kg, similar al volumen en plasma. El volumen de estado estacionario (VSS) de la distribución promedia 39 ml/kg en todas las dosis IV. El análisis exponencial indica que αOPGL-1 tiene una vida media de distribución (t<sub>1/2α</sub>) de 6.02 horas, una fase secundaria extendida con una vida media (t<sub>1/2β</sub>) que aumenta con la dosis de 86.9 horas a una dosis de 0.1 mg/kg a un máximo de 444 horas a una dosis de 10.0 mg/kg. La vida media de eliminación terminal (t<sub>1/2z</sub>) se calcula en promedio no compartimental 31 horas en todos los grupos de dosis IV. Se encuentra que el depuramiento (CL, CL/F) de αOPGL-1 es no lineal, y los animales que reciben dosis IV de 10 mg/kg con una depuración promedio (0.120 ml/hr/kg) que es 3.3 veces más bajo que aquellos que reciben 0.1 mg/kg (0.401 ml/hr/kg).

Después de la administración por vía subcutánea, la absorción es lenta, con concentraciones pico promedio (C<sub>max</sub>) de 11.600 ng/ml a las 132 h. Existe una gran variabilidad en el rango de exposición después de la administración SC, lo que da como resultado una depuración promedio de 0.387 ± 0.281 ml/hr/kg y un tiempo de residencia promedio de 202 ± 80.1 horas. La biodisponibilidad promedio es del 89%.

Los datos anteriores se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Media (± DE) de parámetros<sup>a</sup> farmacocinéticos no compartidos medios en monos Cynomolgus después de administrar una dosis única de αOPGL-1 IV y SC

Estimaciones de parámetros no compartimentales						
Parámetro	Unidad	1.0 mg/kg		0.1 mg/kg	1.0 mg/kg	10 mg/kg
		SC (n=6)		IV (n=2)	IV (n=2)	IV (n=2)
		Media	SD	Media	Media	Media
T <sub>max</sub>	hr	132	60.2	0	0	0
C <sub>max</sub>	ng/ml	11600	3410	4330	38200	326000

T <sub>1/2,z</sub>	hr	34.9	11.1	30.7	31.4	ND <sup>b</sup>
AUC <sub>(0-∞)</sub>	µmg*hr/ml	3520	1750	253	3950	99900
CL, CL/F	ml/hr/kg	0.387	0.281	0.401	0.256	0.120
MRT	hr	202	80.1	84.8	124	519
V <sub>ss</sub>	ml/kg	N/A <sup>c</sup>	N/A	33.7	31.7	55.9

<sup>a</sup> Los valores se informan a 3 cifras significativas

<sup>b</sup> No determinado, las muestras de PK terminan durante la fase de meseta (β), por lo que no se observa la fase terminal

<sup>c</sup> No aplicable

- El αOPGL-1 provoca una disminución rápida en los niveles de N-Tx en suero dentro de las 24 horas posteriores a la dosis (Figura 14). Se observa que el tiempo promedio de efecto máximo ocurre entre 12 horas y 7 días después de la dosis a medida que aumenta la dosis IV de 0.1 a 10 mg/kg, y entre 12 horas y 11 días en animales que reciben una dosis SC de 1.0 mg/kg. El efecto máximo aumenta con la dosis de aproximadamente 80 a 91% en el rango de dosis de 0.1 a 1 mg/kg. Sin embargo, a dosis más altas no se observa supresión adicional con una inhibición máxima del 91%. Los niveles medios de N-Tx en suero vuelven al valor inicial el día 28 después de administrar 0.1 mg/kg IV y el día 70 después de administrar 1 mg/kg de SC. El N-Tx en orina muestra tendencias similares a aquellas del N-Tx en suero, excepto que todos los grupos vuelven a los valores de iniciales por día de estudio 105 (Figura 15).
- La supresión del Ca en suero aumenta con la dosis hasta un nadir medio de 31.6% por debajo del promedio del valor de referencia siete días después de administración IV de 10.0 mg/kg. Todos los otros grupos de dosis tienen disminuciones medias en el Ca en suero de menos de 26.4% a partir de sus promedios de valores de referencia. Para el día 17, todos los niveles en sueros de Ca en los animales tratados vuelven a estar dentro del 10% de sus promedios de valores de iniciales (Figura 20).
- Como la resorción y formación ósea están íntimamente ligadas, también se observan cambios en los marcadores de formación ósea (ALP) con una disminución mucho más lenta en los niveles de ALP y una supresión más prolongada que el marcador de formación, N-Tx (Figura 21). La observación de marcadores de resorción ósea disminuye antes de que los marcadores de formación ósea (ALP) después de dosificación con αOPGL-1 confirmen que el αOPGL-1 es un agente antirresortivo óseo.
- La mayoría de los animales (9 de 12) desarrollan anticuerpos contra αOPGL-1. La incidencia de anticuerpos contra αOPGL-1 no depende de la dosis ni de la ruta. No es posible evaluar el efecto de los anticuerpos contra αOPGL-1 sobre la farmacocinética de αOPGL-1 por encima de 0.1 mg/kg cuando ningún grupo de dosis tiene animales con anticuerpos tanto positivos como negativos. A 0.1 mg/kg IV, la mayoría de αOPGL-1 se elimina antes del desarrollo del anticuerpo y, por lo tanto, no se observan efectos sobre la disposición de αOPGL-1 (Figura 16).
- Los aspectos de la descripción anterior se describirán ahora con referencia a las siguientes cláusulas específicas:
1. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.
  2. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma, y en el que la cadena ligera comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma.
  3. El anticuerpo de la cláusula 2, en el que la cadena pesada y la cadena ligera se conectan mediante un ligador flexible para formar un anticuerpo de cadena sencilla.
  4. El anticuerpo de la cláusula 3, que es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
  5. El anticuerpo de la cláusula 2, que es un anticuerpo Fab.
  6. El anticuerpo de la cláusula 2, que es un anticuerpo Fab'.
  7. El anticuerpo de la cláusula 2, que es un anticuerpo (Fab')<sub>2</sub>.
  8. El anticuerpo de la cláusula 2, que es completamente humano.
  9. El anticuerpo de la cláusula 2, en el que el anticuerpo inhibe la unión de OPGL a un receptor de diferenciación y activación de osteoclastos (ODAR).
  10. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma.

11. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma.
12. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.
- 5 13. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma.
14. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma.
- 10 15. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma.
16. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.
- 15 17. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena ligera comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma.
18. Un anticuerpo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera,  
 (a) en el que la cadena pesada comprende una primera región variable, y en el que la primera región variable comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13,  
 20 y  
 (b) en el que la cadena ligera comprende una segunda región variable, y en el que la segunda región variable comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 14,  
 y  
 (c) en el que el anticuerpo interactúa con un ligando de osteoprotegerina (OPGL).
- 25 19. El anticuerpo de la cláusula 8, en el que la primera región variable comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13, y en el que la segunda región variable comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 14.
- 30 20. El anticuerpo de la cláusula 18, en el que la primera región variable comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 13, y en el que la segunda región variable comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 14.
21. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo 1 a 9 o 14 a 20.
- 35 22. La composición farmacéutica de la cláusula 21, que comprende adicionalmente por lo menos un agente terapéutico seleccionado de un factor morfogénico óseo, factor- $\beta$  de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), un inhibidor de interleuquina-1 (IL-1), IL-1ra, Kineret™, un inhibidor de TNF $\alpha$ , un receptor de TNF $\alpha$  soluble, Enbrel™, un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , Remicade™, un anticuerpo D2E7, una hormona paratiroides, un análogo de una hormona paratiroides, una proteína relacionada con hormona paratiroides, un análogo de una proteína relacionada con hormona paratiroides, una prostaglandina, un bisfosfonato, un alendronato, fluoruro, calcio, un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un inhibidor de COX-2, Celebrex™, Vioxx™; un inmunosupresor, metotrexato, leflunomida, un inhibidor de serina proteasa, un inhibidor de proteasa leucocitaria secretora (SLPI), un inhibidor IL-6, un anticuerpo para IL-6, un inhibidor de IL-8, un anticuerpo para IL-8, un inhibidor de IL-18, una proteína de unión de IL-18, una anticuerpo IL-18, un modulador de enzima que convierte interleuquina-1 (ICE), un factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), un modulador de FGF, una antagonista PAF, un factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), una molécula relacionada con KGF, un modulador de KGF; un modulador de metaloproteinasas de matriz (MMP), un modulador de óxido nítrico sintasa (NOS), un modulador de receptor glucocorticoide, un modulador de receptor de glutamato, un modulador de niveles de lipopolisacárido (LPS), una noradrenalina, un imitador de noradrenalina, y un modulador de noradrenalina.
- 40 23. La composición farmacéutica de la cláusula 22, en la que por lo menos un agente terapéutico se selecciona de Kineret™, Enbrel™, Remicade™, anticuerpo D7E7, y metotrexato.
- 50 24. Un método para detectar el nivel de OPGL en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo de la cláusula 2.
25. Un método para tratar un trastorno osteopéxico en un paciente, que comprende administrar la composición farmacéutica de la cláusula 21.
- 55 26. Un método para tratar un trastorno osteopéxico en un paciente, que comprende administrar la composición farmacéutica de la cláusula 22.

27. Un método para tratar una afección inflamatoria con pérdida ósea asistida en un paciente, que comprende administrar la composición farmacéutica de la cláusula 22.
28. Un método para tratar una afección autoinmunitaria con pérdida ósea asistida en un paciente, que comprende administrar la composición farmacéutica de la cláusula 22.
- 5 29. Un método para tratar artritis reumatoide en un paciente, que comprende administrar la composición farmacéutica de la cláusula 22.

# ES 2 675 735 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Anticuerpos para OPGL

<130> 06843.0049-00000

5 <150> 60/301,172

<151> 2001-06-26

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

10 <211> 1426

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

```
aagcttgacc accatggagt ttgggctgag ctggcttttt. cttgtggcta ttttaaaagg      60
tgtccagtgt gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc      120
cctgagaactc tctgtgcoag cctctggatt cacctttage agctatgcca tgagctgggt      180
cggccaggct ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcaggt attactggga gtggtggtag      240
tacatactac gcagaactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa      300
caogctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcogtat attactgtgc      360
```

ES 2 675 735 T3

gaaagatcca gggactacgg tgattatgag ttggttogac cctggggcc agggaacct 420  
 ggtcacogtc tctcagcct ccaccaaggg cccatoggtc ttccccctgg cgcctgctc 480  
 caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgctg gtcaaggact acttccccga 540  
 accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc totgaccagc gggctgcaca ccttcccagc 600  
 tgtcctacag tctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctcagcaa 660  
 cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga 720  
 caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtoga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc 780  
 aggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac 840  
 cctgaggtc acgtgcgtg tgggtggacgt gagccaagaa gaccccgagg tccagttcaa 900  
 ctggtacgtg gacggcgtg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt 960  
 caacagcagc ttccgtgtg tcagcgtct caccgttgtg caccaggact ggctgaaagg 1020  
 caaggagtac aagtgcagg tctccaaca aggcctcca gccccatcg agaaaacct 1080  
 ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catccggga 1140  
 ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtg aaaggttct accccagcga 1200  
 catgcctgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc 1260  
 catgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag 1320  
 gtggcagcag gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgc acaaccacta 1380  
 caagcagaag agcctctccc tgtctcggg taaatgataa gtcgac 1426

<210> 2

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

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

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

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

ES 2 675 735 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala  
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His



ES 2 675 735 T3

tctagaccac catggaacc ccagcgcagc ttctcttctt cctgctactc tggetcccag 60  
 ataccacogg agaaattgtg ttgacgcagt ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg 120  
 aaagagccac cctctcctgt agggccagtc agagtgttcg cggcaggtac ttagcctggg 180  
 accagcagaa acctggccag gctcccagge tctcctctta tgggtgcatcc agcagggcca 240  
 ctggcatccc agacagggtc agtggcagtg ggtctgggac agacttcact ctccaccatca 300  
 gcagactgga gctgaagat tttgcagtgt tttactgtca gcagtatggt agttcacctc 360  
 ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgaac tgtgggtgca ccatctgtct 420  
 tcatcttccc gccatctgat gagcagtga aatctggaac tgctctgtt gtgtgcctgc 480  
 tgaataactt ctatcccaga gaggccaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat 540  
 cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca 600  
 gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcttgogaag 660  
 tcaccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttgat 720  
 aagtgcac 728

<210> 4

<211> 235

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Val Arg Gly Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro



<220>  
<223> cebador RACE kappa 3'  
<400> 6  
aagggtcaga ggacaaagga tgg 23  
5 <210> 7  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
10 <223> cebador kappa anti-OPGL-1 5'  
<400> 7  
caactctaga ccacccatgga aaccccagcg 30  
<210> 8  
<211> 37  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> cebador kappa anti-OPGL-1 3'  
<400> 8  
20 ttgacgtcg acttatcaac actctcccct gttgaag 37  
<210> 9  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
25 <220>  
<223> cebador RACE IgG2 5'  
<400> 9  
ggcacggtca ccacgctgct gag 23  
<210> 10  
30 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> cebador RACE IgG2 3'  
35 <400> 10  
cctccaccaa gggcccatcg gtct 24  
<210> 11  
<211> 51  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Cebador IgG2 anti-OPGL-1 5'

ES 2 675 735 T3

<400> 11

cagaagcttg accaccatgg agtttgggct gagctggctt ttcttgtag c 51

<210> 12

<211> 37

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 12

10 gcatgtcgac ttatcattta cccggagaca gggagag 37

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 13

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 14

ES 2 675 735 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 15

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador aleatorio

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (18)..(23)

<223> N es A, C, G, o T

<400> 15

ggccgatag gcctcacnnn nnnt 24

<210> 16

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> traducción de porción de cebador kappa anti-OPGL-1 5'

20 <400> 16

Met Glu Thr Pro Ala  
 1 5

<210> 17

<211> 6



<222> (3)..(3)  
<223> Xaa es D-Pal, en el que Pal es 3-(3'-piridil)alaninilo  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
5 <222> (5)..(5')  
<223> Xaa es N-metil tirosina  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
10 <223> Xaa es D-asparagina  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa es N-ypsilón-2-propil-lisinilo  
15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
<223> Xaa es D-alanina-NH2  
<400> 20  
  
Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Pro Xaa  
1 5 10  
20

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, en la que el primer polinucleótido codifica una cadena pesada y el segundo polinucleótido codifica una cadena ligera, en la que:
- 5 a) la cadena pesada se selecciona de una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de polipéptido de la misma que tiene suficiente secuencia de regiones variables para conferir especificidad para un OPGL, y
- la cadena pesada comprende una primera región variable que comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad a la secuencia establecida en la SEQ ID NO:13, y
- b) la cadena ligera se selecciona de una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de polipéptido de la misma que tiene suficiente secuencia de regiones variables para conferir especificidad para un OPGL, y
- 10 la cadena ligera comprende una segunda región variable que comprende una secuencia que tiene por lo menos 90% de identidad a la secuencia establecida en la SEQ ID NO:14, y
- en la que un anticuerpo que comprende la cadena pesada y la cadena ligera se une a un ligando de osteoprotegerina (OPGL) e inhibe la unión de OPGL a un receptor de diferenciación y activación de osteoclastos (ODAR),
- 15 en la que un exceso de anticuerpo reduce la unión en por lo menos 20% según se mide en un ensayo de unión competitiva in vitro.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la cadena pesada codificada por el primer nucleótido comprende una primera región variable que comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:13, y en la que la cadena ligera codificada por el segundo nucleótido comprende una segunda región variable que comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:14.
- 20 3. La composición de la reivindicación 1, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido comprende una primera región variable que comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:13, y en la que la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido comprende una segunda región variable que comprende una secuencia que tiene por lo menos 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:14.
- 25 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido comprende las tres CDR de la SEQ ID NO:13, en la que la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido comprende las tres CDR de la SEQ ID NO:14.
- 30 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 13 y la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 14.
- 35 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido comprende la región variable y la región constante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que tiene una eliminación, adición o sustitución de un aminoácido; y en la que la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido comprende la región variable y la región constante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que la eliminación, adición o sustitución de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 es una eliminación de aminoácidos carboxi terminal.
- 40 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido comprende la región variable y la región constante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y en la que la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido comprende la región variable y la región constante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 45 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido consiste en la región variable y la región constante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y en la que la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido consiste en la región variable y la región constante de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 50 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2 y la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.
11. La composición de la reivindicación 8, en la que la cadena pesada codificada por el primer polinucleótido consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 2, y en la que la cadena ligera codificada por el segundo polinucleótido consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.

12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada y la cadena ligera forman un anticuerpo Fab.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada y la cadena ligera forman un anticuerpo Fab'.
- 5 14. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada y la cadena ligera forman un anticuerpo F(ab')<sub>2</sub>.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la cadena pesada y la cadena ligera forman un anticuerpo de cadena sencilla.
- 10 16. La composición de la reivindicación 15, en la que el anticuerpo de cadena sencilla es un anticuerpo Fv de cadena sencilla.
17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la cadena pesada y la cadena ligera forman un anticuerpo completamente humano.
18. Una célula huésped que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
19. La célula huésped de la reivindicación 18, que es una célula huésped de mamífero.
- 15 20. La célula huésped de la reivindicación 19, que se selecciona de una célula de ovario de hámster chino, una célula HeLa, una célula de riñón de hámster bebé, una célula de riñón de mono y una célula de carcinoma hepatocelular humano.
21. Un método para producir un anticuerpo que interactúa con el ligando de osteoprotegerina (OPGL) que comprende cultivar una célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.

**FIGURA 1****ADNc de Cadena Pesada  $\alpha$ OPGL-1**

Secuencia de ADN de plásmido de expresión cadena pesada que inicia en el sitio HindIII, a través del sitio Sall. El codón de inicio empieza en nt 14, el codón de parada empieza en nt 1415.

```

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

```

## FIGURA 2

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada  $\alpha$ OPGL-1

Se subraya el péptido señal IgG2, la región variable está en mayúsculas y no se subraya, y la región constante está en minúsculas

```

1  MEFGLSWLFL VAILKGVOCE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP
61  GKGLEWVSGI TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
121 TTVIMSWFDP WGQGTLVTVS Sastkgpsvf plapcsrsts estaalgclv kdyfpepvtv
181 swnsгалtsg vhtfpavlqs sglyslssv tvpssnfgtq tytcnvdhkp sntkvdkve
241 rkccvecppc pappvagpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed pevqfnwyvd
301 gvevhnaktk preeqfnstf rvsvltvvh qdwlngkeyk ckvsnglpa piektisktk
361 gqprepvyt lppsreemtk nqvsltclvk gfypsdiave wesngqpenn ykttppmls
421 dgsfflyskl tvdksrwqqg nvfscsvmhe alhnhytqks lsispqk (SEQ ID NO: 2)

```

**FIGURA 3****ADNc de Cadena Ligera kappa  $\alpha$ OPGL-1**

Secuencia de ADN de la secuencia de plásmido de expresión de cadena kappa del sitio XbaI a través del sitio Sall. El codón de inicio empieza en nt 12; el codón de inicio empieza en nt 717

```

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

```

**FIGURA 4****Secuencia de aminoácidos de cadena ligera kappa  $\alpha$ OPGL-1**

Se subraya el péptido de señal kappa, la región variable está en mayúsculas y no se subraya, y la región constante está en minúsculas.

```

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

```

**FIGURA 5**

**Mapa circular de plásmido de  $\alpha$ OPGL-1-kappa/pDSRa19**

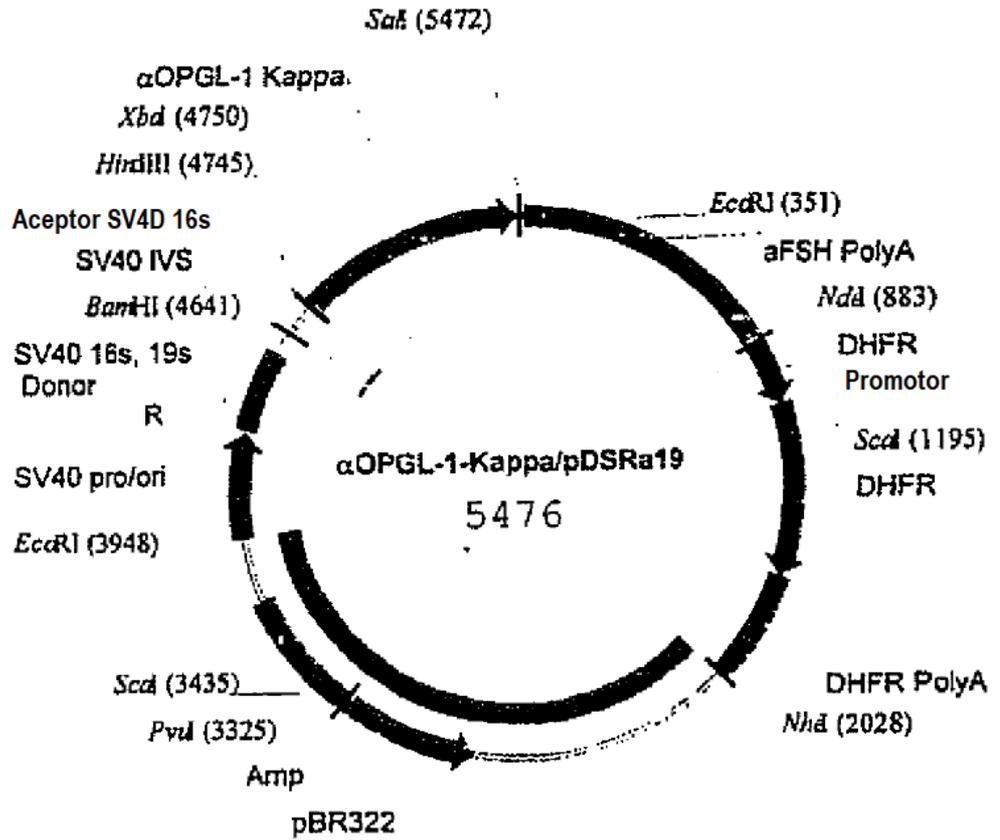


FIGURA 6

Mapa circular de plásmido de  $\alpha$ OPGL-1-IgG2/pDSRa19

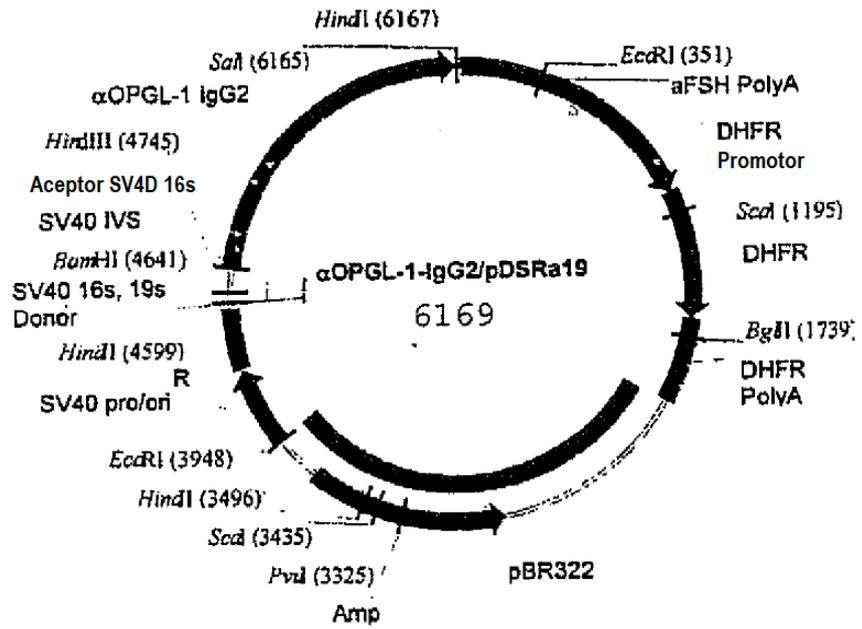
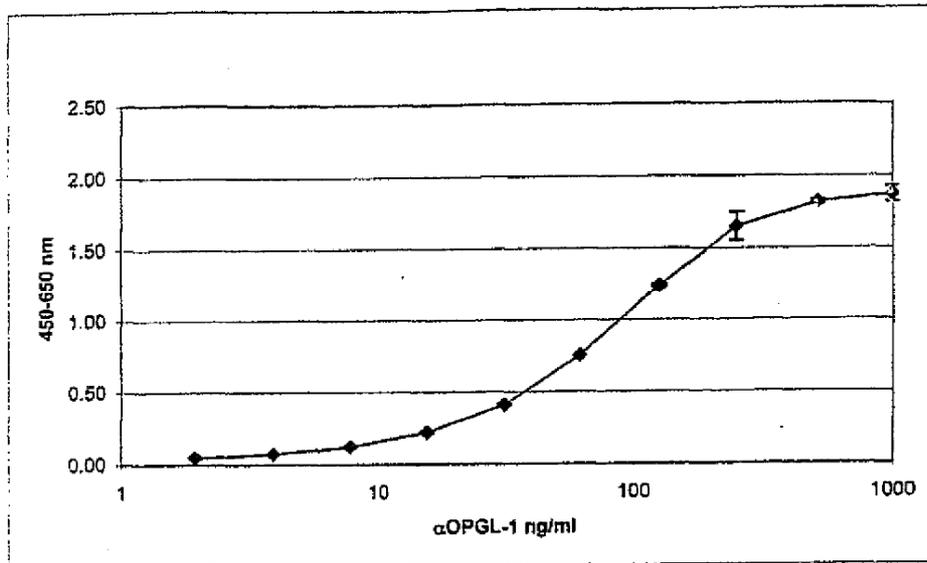


FIGURA 7

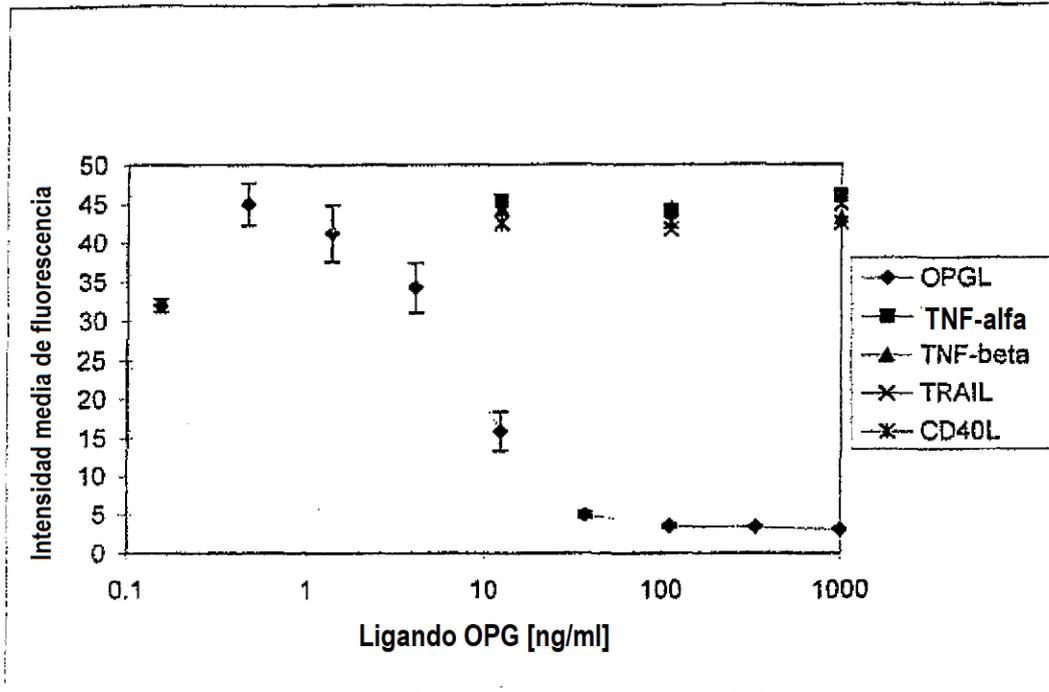
$\alpha$ OPGL-1 se une al ligando OPG soluble recubierto en la placa EIA en forma dependiente de la dosis



Las placas EIA de 96 pozos se recubren con OPG soluble recombinante. Se agregan concentraciones variantes de  $\alpha$ OPGL-1 a los pozos y se incuban durante aproximadamente 2 hr a temperatura ambiente. Se detecta anticuerpo de unión con peroxidasa de rábano silvestre IgG (Fab') antihumano de cabra. La absorbancia se lee en 450 nm y 650 nm.

FIGURA 8

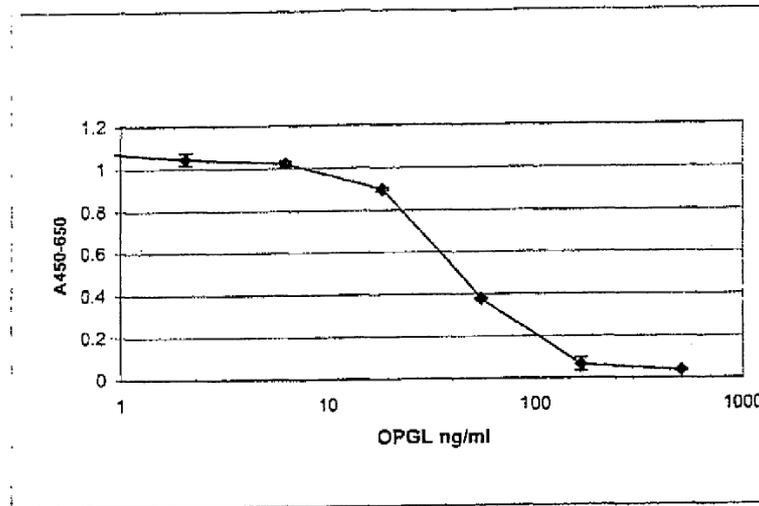
$\alpha$ OPGL-1 se une específicamente al OPGL unido a membrana



El L  $\alpha$ OPGL-1 se une al OPGL expresado sobre una superficie celular de células CHO REN 218-9 transfectadas en forma dependiente de la dosis. Esta unión se completa al agregar de manera exógena OPGL humano pero no ligando TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , TRAIL o CD40. Se preincuba  $\alpha$ OPGL-1 (100 ng/ml) con concentraciones variables de OPGL solubles u otros ligandos y luego se incuba con células CHO REN 218-9 que expresan OPGL sobre la superficie. Posteriormente se incuban las células durante 30 minutos a 2-8 °C con IgG antihumano de cabra F(ab')<sub>2</sub> etiquetado FITC, fragmento Fc $\gamma$  específico. Después de centrifugación y lavado de la superficie celular se mide la fluorescencia utilizando citometría de flujo.

FIGURA 9

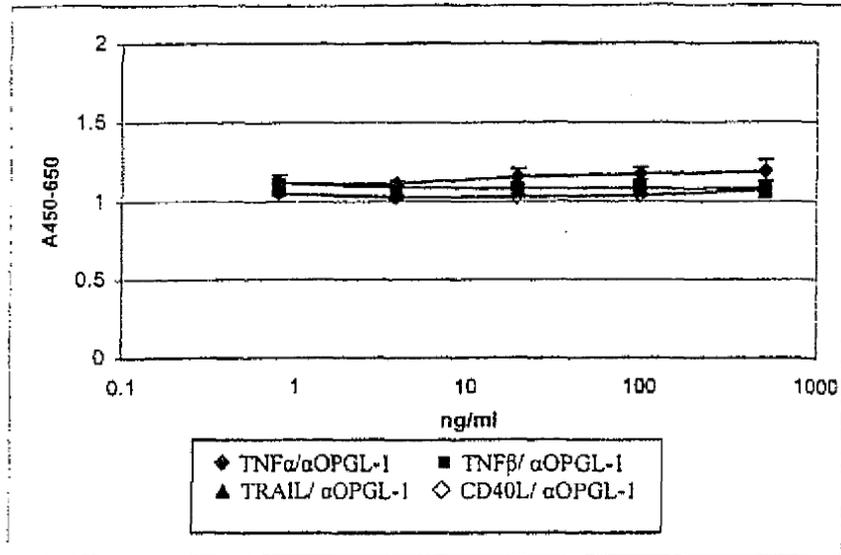
$\alpha$ OPGL-1 se une al OPGL soluble



$\alpha$ OPGL-1 que se une específicamente al OPGL en una placa EIA se reduce competitivamente al agregar de manera exógena OPGL soluble.

FIGURA 10

**$\alpha$ OPGL-1 no se une a los integrantes de la familia TNF los ligandos TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TRAIL, o CD40**



**$\alpha$ OPGL-1 que se une a OPGL sobre una placa EIA no se reduce al agregar de manera exógena los ligandos TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TRAIL, o CD40**

FIGURA 11

Inhibición dependiente de la dosis mediante  $\alpha$ OPGL-1 de actividad TRAP inducida por ligando OPG en células RTAW 264.7

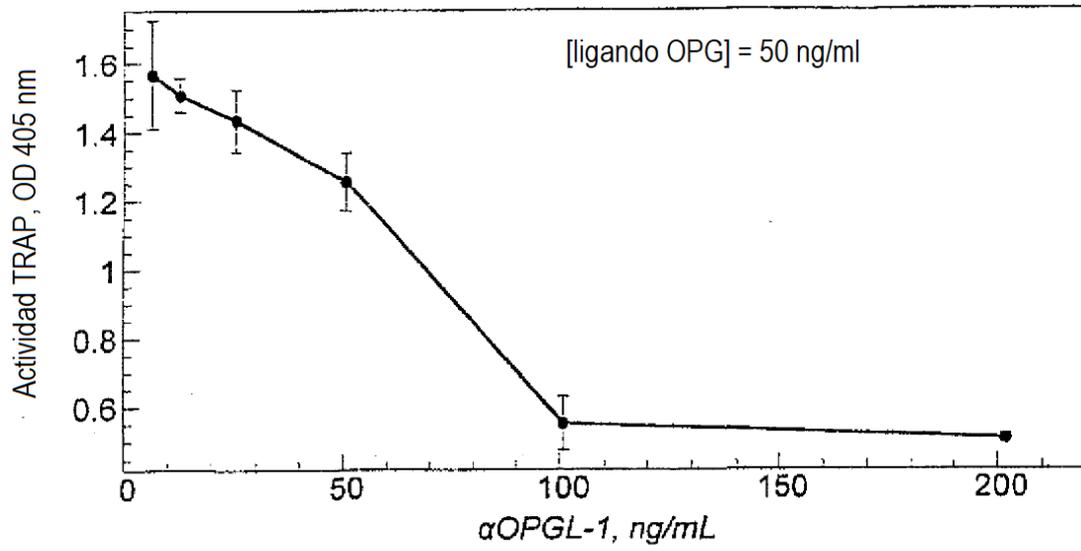


FIGURA 12

Inhibición dependiente de la dosis mediante  $\alpha$ OPGL-1 de ligando OPG etiquetado con Europio que se une a ODAR/FLAF/anti/FLAG/APC

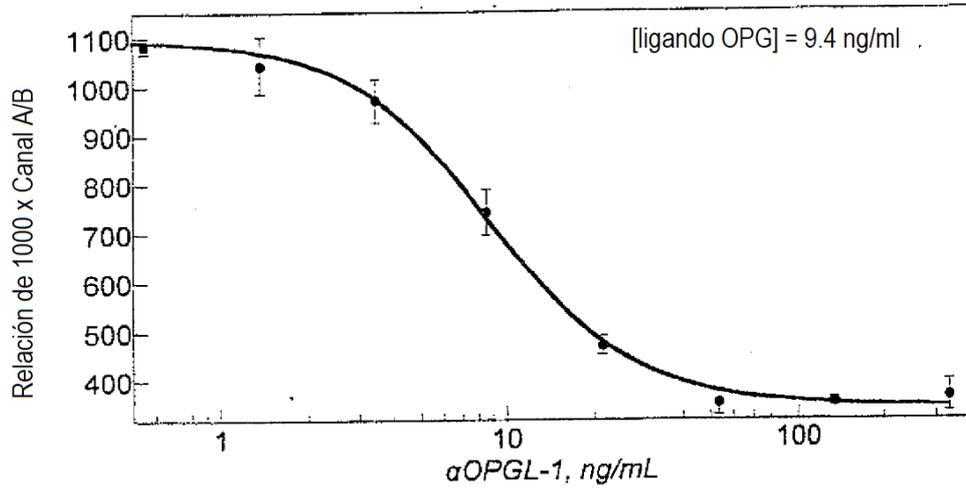


FIGURA 13

Perfiles del tiempo de concentración en suero media ( $\pm$  DE) luego de administración de dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus* en dosis de 0.1, 1 y 10.0 mg/kg IV (n+2/dosis) y 1.0 mg/kg SC (n = 6/dosis)

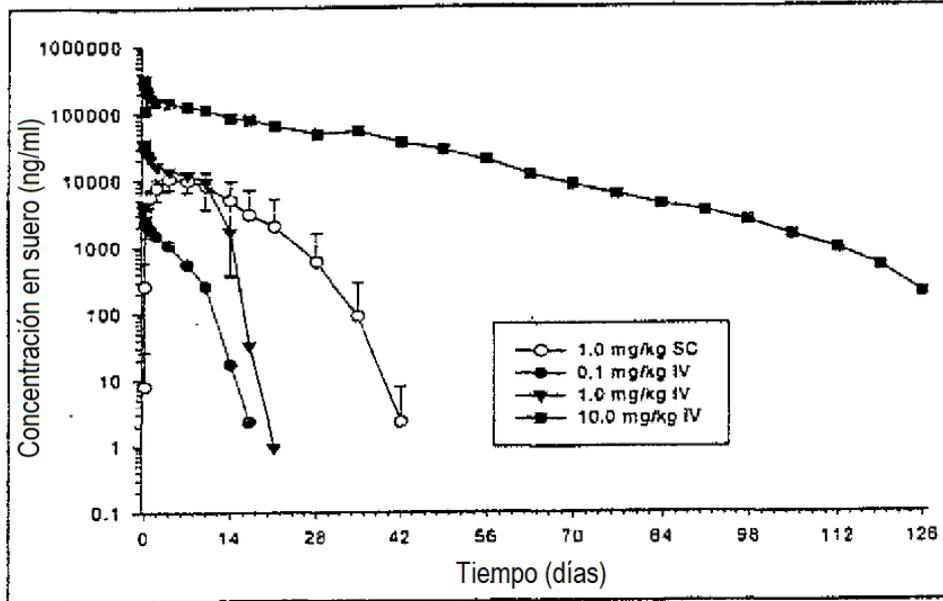


FIGURA 14

Cambio porcentual medio ( $\pm$  DE) en concentración de N-Tx en suero después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 IV (n=2/dosis) o SC (n=6) a Monos *Cynomolgus* en dosis de 0.1, 1 y 10.0 mg/kg.

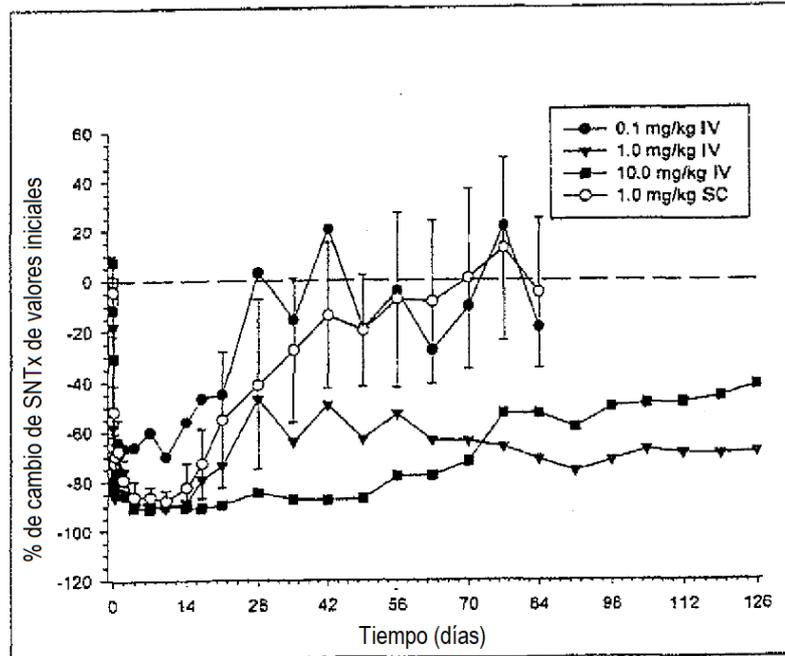


FIGURA 15

Cambio porcentual medio ( $\pm$  DE) en concentración de N-Tx en orina después de administración de dosis única IV (n=2/dosis) o SC (n=6) de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus* en dosis de 0.1, 1 y 10.0 mg/kg

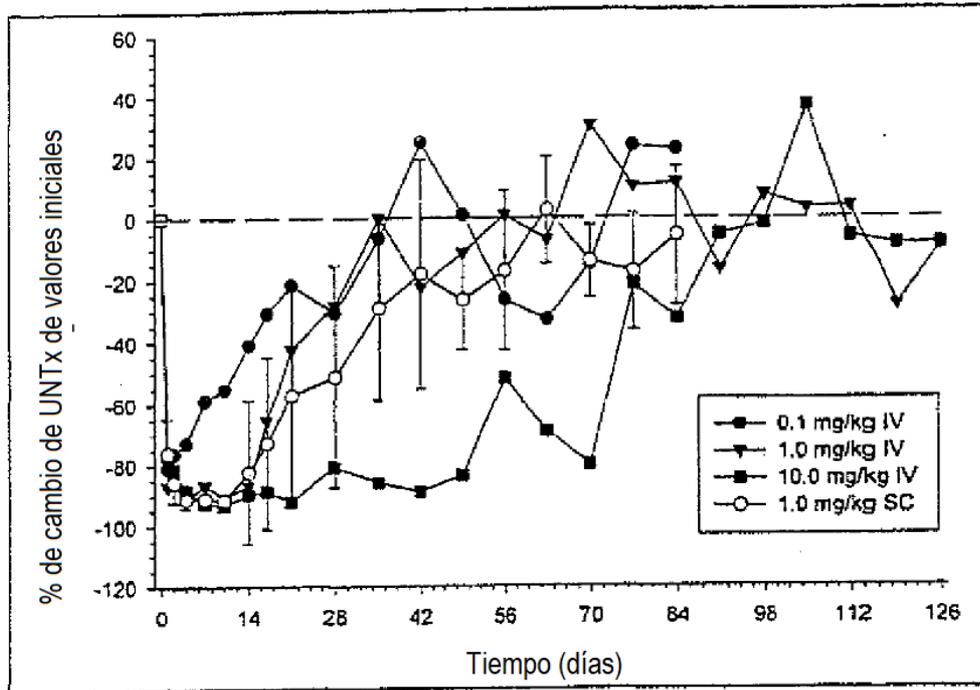
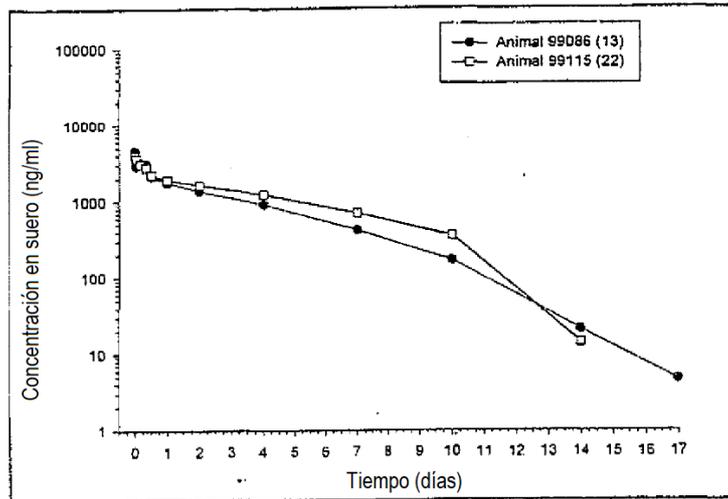


FIGURA 16

Perfiles del tiempo de concentración en suero en animales de anticuerpo positivo (símbolos negros abiertos) y negativo (símbolos rojos cerrados) después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 IV a monos *Cynomolgus* en dosis de 0.1 mg/kg



**FIGURA 17**

**Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de  $\alpha$ OPGL-1**

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

**FIGURA 18**

**Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de  $\alpha$ OPGL-1**

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

FIGURA 19

Diagrama de flujo de proceso de cultivo celular

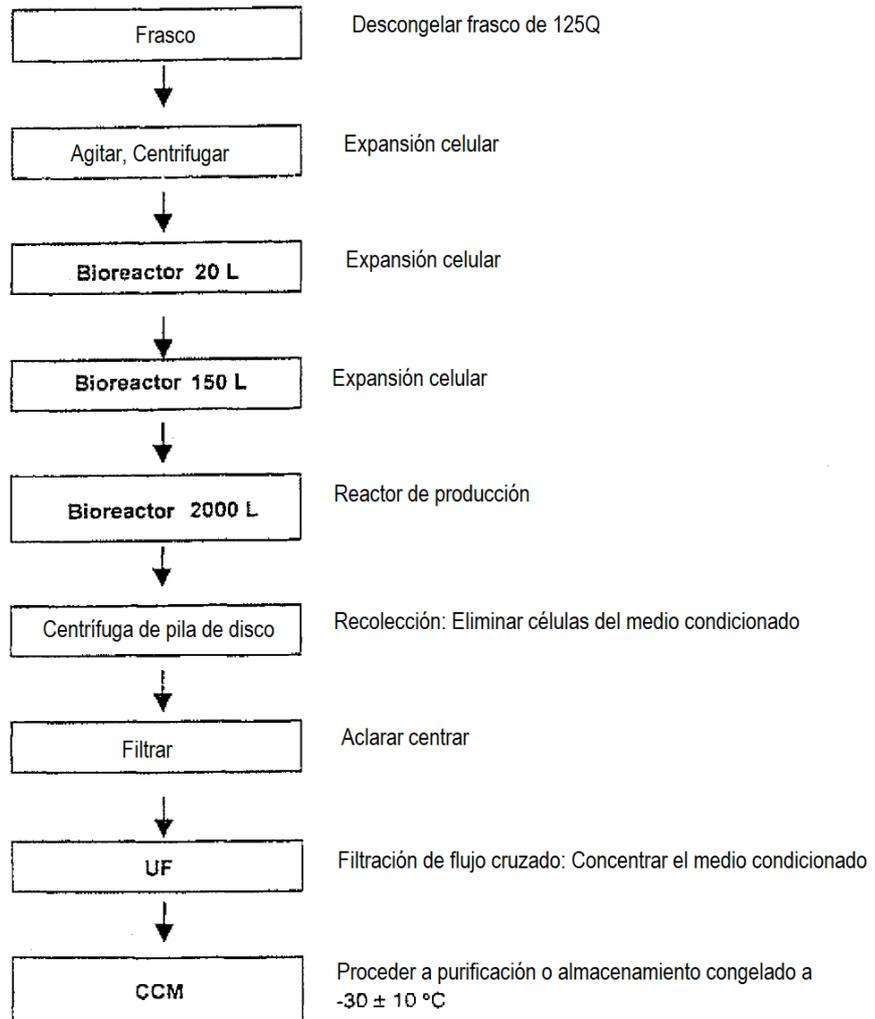


FIGURA 20

Cambio porcentual medio de calcio en suero de valores iniciales después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 a monos *Cynomolgus*

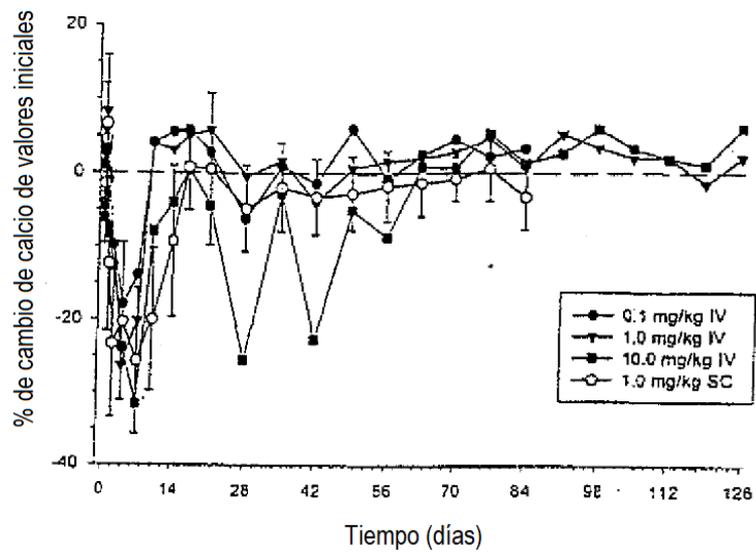


FIGURA 21

Cambio porcentual medio de fosfatasa alcalina en suero de valores iniciales después de administrar una dosis única de  $\alpha$ OPGL-1 a monos Cynomolgus

