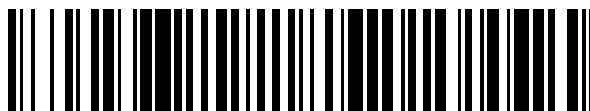


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 049**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 16180079 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3141561**

54 Título: **Inducción anti-TGF-beta de crecimiento óseo**

30 Prioridad:

**24.04.2009 US 172539 P**

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

**27.02.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**EDWARDS, JAMES R. y  
MUNDY, GREGORY R.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 702 049 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

Inducción anti-TGF-beta de crecimiento óseo

**Antecedentes de la invención**

5 La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional estadounidense serie No. 61/172.539, registrada el 24 de abril de 2009.

**I. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a los campos de la biología molecular y la medicina. Más en particular, se refiere a los campos de enfermedades y lesiones óseas, reparación ósea, implantes óseos, injertos óseos, enfermedades periodontales y cáncer. Específicamente, trata del uso de anticuerpos anti-TGF- $\beta$  para aumentar el crecimiento óseo y aumentar la masa y/o el volumen óseo y tratar así enfermedades óseas como osteoporosis, así como traumatismo óseo, fractura ósea o enfermedad de Paget.

**II. Técnica relacionada**

15 Más de 200 millones de personas de todo el mundo sufren de enfermedades óseas como osteoporosis, fracturas óseas y enfermedades periodontales (gingivales en las que el diente pierde el hueso circundante). La osteoporosis representa un problema sanitario de envergadura y cada vez mayor para el que se requieren terapias de estimulación de la formación del hueso que aún no están satisfechas médicamente. La mayoría de los fármacos actuales contra la osteoporosis retardan la degradación del hueso pero no estimulan la formación del hueso para sustituir el hueso que ya se ha perdido. Los compuestos que estimulan la formación del hueso representan por tanto una necesidad no satisfecha dentro del área de las enfermedades óseas. Se sabe que la osteoporosis afecta a aproximadamente 100 millones de personas en todo el mundo – 325 millones de las cuales viven en Estados Unidos, Europa occidental y Japón. Por otra parte, más de 25 millones de individuos padecen fracturas de huesos al año, 60 millones tienen enfermedades periodontales (en las que el diente pierde el hueso de la mandíbula) y otros 18 millones tienen otras enfermedades óseas, como cáncer de hueso.

25 La mayoría de las terapias actuales para pacientes con osteoporosis se centran en la prevención de la pérdida de hueso, no en la formación de hueso. Esto continúa siendo una importante consideración, ya que existe una significativa morbilidad y mortalidad asociada con el encamado prolongado en las personas de edad que tiene lugar tras una fractura de hueso, en particular, aquellas que padecen fracturas de cadera. Las complicaciones del encamado incluyen coágulos de sangre y neumonía. Estas complicaciones están reconocidas y se suelen tomar medidas generalmente para evitarlas, si bien apenas constituyen el mejor enfoque de terapia.

30 Otra cuestión sanitaria relacionada con los huesos es la reconstrucción ósea y, específicamente, la capacidad para reconstruir los defectos en el tejido óseo que se derivan de una lesión traumática, como consecuencia de cáncer o cirugía del cáncer, como resultado de un defecto congénito o como resultado de la edad. Existe una significativa necesidad de implantes ortopédicos más frecuentes y los huesos craneales y faciales son dianas en particular para este tipo de necesidades de reconstrucción. La disponibilidad de nuevos materiales de implante, p.ej., titanio, ha permitido la reparación de defectos relativamente grandes. Los implantes de titanio proporcionan una excelente estabilidad temporal a través los defectos óseos. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que la falta de un hueso viable que subsane el defecto puede tener como resultado la exposición del aparato, infección, inestabilidad estructural y, finalmente, fracaso en la reparación del defecto.

40 Los injertos óseos autólogos son otra posibilidad para tratar las lesiones óseas, pero se ha demostrado que presentan varias desventajas ya que deben recogerse del sitio de un donante como la cresta ilíaca o la costilla, no suelen proporcionar el hueso suficiente para completar el rellenado del defecto y el hueso que se forma tiende a veces a la infección y la resorción. Las preparaciones xenogéneas parcialmente purificadas no son prácticas para su uso clínico ya que se purifican cantidades de microgramos desde kilogramos de hueso bovino, de manera que la producción comercial a gran escala resulta costosa e impracticable. Por tanto, se emplean aloinjertos y preparaciones de hueso desmineralizado. Las transferencias microquirúrgicas de injertos de hueso libre con tejido blando unido y vasos sanguíneos pueden cerrar defectos óseos y permitir una fuente inmediata de riego sanguíneo al injerto. Sin embargo, estas técnicas requieren tiempo, se ha demostrado que producen un alto grado de morbilidad y únicamente pueden ser empleadas por individuos entrenados.

50 Otra forma de enfermedad ósea es la que se deriva del cáncer. Existe una serie de cánceres que tienen metástasis en el hueso y pueden tener como resultado el debilitamiento del hueso y algunos están asociados incluso con la destrucción ósea y la pérdida de hueso, como el cáncer de mama, pulmón, tiroides, renal y de próstata. Por otra parte, el mieloma múltiple y su enfermedad ósea del mieloma asociada (MBD por sus siglas en inglés) no es un cáncer metastásico, sino que las células de mieloma se derivan de linfocitos B en el sistema inmunitario que residen normalmente en la médula ósea y por tanto están íntimamente asociadas con el hueso. De hecho, el microentorno de la médula ósea desempeña un importante papel en el crecimiento, supervivencia y resistencia a quimioterapia de las células de mieloma, que a su vez regulan el aumento de la pérdida de hueso asociada con dicho trastorno (la web internacional en [multiplemyeloma.org](http://multiplemyeloma.org)). Más de un 90 % de los pacientes con mieloma tienen implicación ósea,

frente a 40-60 % de los pacientes de cáncer, que tienen metástasis ósea, y más de 80 % de estos pacientes MDB tienen dolor óseo intratable. Por otra parte, aproximadamente 30 % de los pacientes con mieloma tienen hipercalcemia, que es el resultado de una mayor actividad osteolítica asociada con esta enfermedad (Cavo y col., 2006).

5 A diferencia de la osteólisis, asociada con otros tumores óseos, las lesiones MBD son únicas en el sentido de que no se curan ni reparan a pesar de que los pacientes tengan muchos años de completa remisión (web internacional en multiplemyeloma.org; Terpos y col., 2005). Mecánicamente, parece estar relacionado con la inhibición y/o pérdida del osteoblasto que forma el hueso durante la progresión de la enfermedad. De hecho, los estudios sobre marcadores de hueso y la histomorfometría indican que aumenta tanto la actividad de osteoblasto como de osteoclasto que reabsorbe el hueso, pero están equilibrados al principio de la enfermedad, mientras que la MBD abierta presenta una alta actividad de osteoclastos y una baja actividad de osteoblastos (web internacional en multiplemyeloma.org) Por lo tanto, la MBD constituye un trastorno en el que la formación del hueso y la pérdida ósea están descompensadas y se beneficiarían de terapias que estimulen tanto la formación de hueso como el retraso de la pérdida. Hasta la fecha, no existen tales terapias. Por lo tanto, continúa existiendo la necesidad de procedimientos mejorados para estimular la formación de hueso y aumentar la resistencia ósea *in vivo* para tratar enfermedades y lesiones óseas, incluyendo cáncer.

20 Stebbins E G y col. "Inhibition of TGF $\beta$  Signaling Enhances Bone Mass, by Increasing Osteoblast and Reducing Osteoclast Number and Activity", Journal of Bone and Mineral Research, vol. 21, no. Suppl. 1, septiembre 2006, página S63, Bone- and-Mineral-Research; Philadelphia, PA, Estados Unidos; septiembre 15 - 19, 2006, desvela la molécula pequeña SD-208 que se dirige contra el receptor TGF- $\beta$ .

Mooney Mark P y col., "Postoperative anti-TGF-beta2 antibody therapy improves intracranial volume and craniofacial growth in craniostotic rabbits", Journal of Craniofacial Surgery, Lippincott Williams & Wilkins, Estados Unidos, vol. 18, no. 2, 1 marzo 2007, páginas 336-349, desvela un anticuerpo que se une a TGF-beta2 solamente para diagnóstico y craniostosis.

## 25 **Sumario de la invención**

La invención se define con las reivindicaciones.

30 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une inmunológicamente a TGF- $\beta$  para su uso en un procedimiento para aumentar la masa y/o el volumen óseo en un sujeto o para su uso en un procedimiento para aumentar el crecimiento óseo en un sujeto, en el que dicho anticuerpo se designa 1D11 (ATCC designación de depósito No. HB 9849), o una versión humanizada de 1D11 o una versión obtenida por ingeniería genética que contiene las CDR de 1D11 en un marco heterólogo en el que dicho sujeto padece de osteoporosis, fractura ósea, pérdida ósea debido a traumatismo o enfermedad de Paget y en el que dicho sujeto no tiene cáncer.

35 En otra realización preferente, se prevé que el anticuerpo para su uso en los procedimientos para aumentar la masa y/o el volumen óseo y el crecimiento óseo de acuerdo con la invención comprenda la administración de dicho anticuerpo a dicho sujeto sistémicamente, en particular, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica.

40 En otra realización preferente se prevé que el anticuerpo para su uso en los procedimientos para aumentar la masa y/o el volumen óseo y el crecimiento óseo de acuerdo con la presente invención comprenda la administración de dicho anticuerpo en un sitio diana del hueso, en particular, en el que el procedimiento para aumentar la masa y/o el volumen óseo comprende inyectar dicho anticuerpo en dicho sitio o a través de un dispositivo de liberación prolongada en dicho sitio.

45 Preferentemente, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la presente invención prevé que dicho sujeto es un ser humano o un animal no humano, en particular, en el que el procedimiento es un procedimiento para aumentar la masa ósea y dicho animal no humano es un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono una vaca.

En una realización preferente, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la invención es una versión humanizada de 1D11.

En otra realización preferente, el anticuerpo para su uso de acuerdo con la presente invención es una versión obtenida por ingeniería genética que contiene las CDR de 1D11 en un marco heterólogo.

50 Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención es 1D11.

55 En otros aspectos de la divulgación, se proporciona un procedimiento para aumentar la masa y/o el volumen óseo en un sujeto que comprende (a) identificar a un paciente que necesita aumentar la masa y/o el volumen óseo; y (b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une inmunológicamente a TGF- $\beta$ . El anticuerpo puede unirse las tres isoformas del TGF- $\beta$ . El anticuerpo puede designarse 1D11 y puede ser una versión humanizada de 1D11 o cualquier versión obtenida por ingeniería genética que contiene las CDR de 1D11 en un marco heterólogo.

En un aspecto, el anticuerpo es tal que se une específicamente a al menos una isoforma de TGF- $\beta$ . En aspectos en particular, el anticuerpo anti TGF- $\beta$  se une específicamente a al menos una forma de TGF- $\beta$  seleccionada del grupo que consiste en TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. En otros aspectos más, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  se une específicamente a al menos: (a) TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 (denominado también "anticuerpo pan-neutralizante"); (b) TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2; (c) TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3; y (d) TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. En varios aspectos, la constante de afinidad  $K_a$  del anticuerpo TGF- $\beta$  para al menos una isoforma de TGF- $\beta$ , que se une específicamente es preferentemente superior a  $10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^8 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ ,  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  o  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ . En otros aspectos más, el anticuerpo de la invención se une específicamente a una proteína sustancialmente idéntica a TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y/o TGF- $\beta$ 3 humana. Se contempla asimismo para su uso en seres humanos formas quiméricas y humanizadas y derivadas de anticuerpos no humanos. Las producciones de dichas variantes es muy conocida entre las personas expertas en la materia (véase, p.ej., Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 2ª ed., Oxford University Press, 1995).

De acuerdo con al presente invención, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  es un anticuerpo monoclonal murino 1D11 producido a través del hibridoma 1D11.16 (Designación de depósito ATCC No. HB 9849, también descrito en las patentes estadounidenses 5.571.714, 5.772.998 y 5.783.185). El anticuerpo 1D11 se une específicamente a las tres isoformas de mamífero de TGF- $\beta$ . La secuencia de la región variable de cadena pesada de 1D11 está disponible con el número de acceso AAB46787. En realizaciones relacionadas, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  es un derivado de 1D11, p.ej., un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR idénticas a las de 1D11 (p.ej., anticuerpo quimérico, humanizado o con CDR-injertada). En otra realización más aún, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  es un anticuerpo recombinante completamente humano.

El anticuerpo se puede administrar a dicho sujeto sistémicamente, por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica. El anticuerpo puede administrarse en un sitio diana del hueso, incluyendo inyección en el sitio. El anticuerpo puede comprender además un dispositivo de liberación prolongada implantado en el sitio.

El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano, como un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono o una vaca. El sujeto puede tener cáncer o no. El procedimiento puede comprender además al menos una segunda administración de dicho anticuerpo, incluyendo posologías de tres administraciones por semana. El sujeto puede recibir al menos 9 administraciones. El sujeto puede padecer osteoporosis, fractura de huesos, pérdida ósea debido a un traumatismo o enfermedad de Paget o pérdida ósea como consecuencia de metástasis de cáncer. El procedimiento puede comprender además evaluar la pérdida ósea tras la administración de dicho anticuerpo, como por ejemplo por obtención de imágenes óseas.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo para su uso en un procedimiento para aumentar el crecimiento óseo en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- $\beta$ . El anticuerpo se une a las tres isoformas de TGF- $\beta$ . El anticuerpo se designa 1D11 o es una versión humanizada de 1D11 o cualquier versión obtenida por ingeniería genética que contiene las CDR de 1D11 en un marco heterólogo. El anticuerpo se puede administrar a dicho sujeto sistémicamente o por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o tópica. Se puede administrar el anticuerpo en el sitio diana del hueso, incluyendo inyección en el sitio. El anticuerpo también puede comprender un dispositivo de liberación prolongada implantado en el sitio. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano, como por ejemplo un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono o una vaca. El sujeto puede tener cáncer o no.

En otros aspectos de la divulgación, se proporciona:

- un procedimiento para aumentar el número de osteoblastos en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- $\beta$ ;
- un procedimiento para disminuir el número de osteoblastos en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- $\beta$ ;
- un procedimiento para aumentar la resistencia ósea en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- $\beta$ ; y
- un procedimiento para disminuir la señalización de TGF- $\beta$  en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF- $\beta$ .

Se contempla que cualquiera de los procedimientos o composiciones descritos en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro procedimiento o composición descrito en el presente documento.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se emplean en combinación con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puedan significar "uno", pero también está en consonancia con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Se contempla que cualquiera de las realizaciones explicadas en la presente memoria descriptiva se pueda implementar con respecto a cualquier procedimiento o composición de la invención y *viceversa*. Asimismo, las composiciones y los kits de la invención pueden utilizarse para conseguir los procedimientos de la invención.

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" tal como se emplea para indicar que el valor incluye la variación inherente de error del dispositivo, el procedimiento que se esté empleando para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

**Breve descripción de los dibujos**

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

**FIG. 1 – Régimen de tratamiento.** Se trataron ratones C57B1/6 (n = 5) i.p. con 1D11 o anticuerpo de control (13C4) 3 veces/semana durante 28 días. Se determinaron los parámetros del esqueleto por escáner microCT, análisis histomorfométrico y análisis bioquímico. Se determinaron también los efectos de la terapia anti-TGF- $\beta$  sobre la distribución celular o la expresión gen/proteína.

**FIGS. 2A-F –El tratamiento con 1D11 aumenta el volumen óseo.** Las imágenes tridimensionales obtenidas de las regiones exploradas por microCT de metafisis tibial (200  $\mu$ m) presentaron un aumento del volumen óseo en los ratones tratados con 1D11 (FIGS. 2A-B), acompañado de un aumento de BV/TV (FIG. 2C) y BMD (FIG. 2D). Se observó asimismo un espesamiento de las trabéculas (FIG. 2E) y una disminución del espacio trabecular dentro de esta región en los animales tratados con 1D11 (FIG. 2F; \* = p < 0,05).

**FIGS. 3A-B –Análisis histomorfométrico.** Los cortes de tejido de las vértebras lumbares descalcificadas de animales tratados con 1D11 presentaron un aumento significativo de BV/TV y cambios positivos en los parámetros trabeculares, en comparación con los animales de control (FIG. 3A, Von Kossa/Van Gieson, \* = p < 0,05). El volumen del hueso largo también aumentó de forma espectacular (FIG. 3B, H&E).

**FIGS. 4A-D – Distribución celular de las células óseas tras el tratamiento con 1D11.** Los cortes tibiales descalcificados teñidos para TRAP presentaron una considerable disminución de los osteoblastos teñidos positivamente que revisten la superficie del hueso trabecular en animales tratados en comparación con los controles (FIG. 4A, aumento original x4; FIG. 4B, aumento original x20; flechas negras = osteoclastos). Se cuantificó la distribución celular por análisis histomorfométrico de cortes teñidos con TRAP y H&E y se demostró una significativa disminución del número de osteoclastos y superficie en el hueso de los ratones tratados con 1D11 (FIG. 4C, \*\* p < 0,01). El número de osteoblastos se elevó significativamente en los ratones tratados con el anticuerpo 1D11 (FIG. 4D, \* p < 0,05).

**FIG. 5 – Análisis biomecánico.** Se examinaron fémures recién diseccionados aislados de ratones tratados con 1D11 y de control biomecánicamente por flexión en 3 puntos. Se colocaron los fémures horizontalmente y se cargaron monótonicamente a una velocidad de 3 min/min en la porción media de la diáfisis. El tratamiento con 1D11 aumentó significativamente la resistencia de flexión, el límite elástico y el módulo de tejido (\*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001).

**Descripción detallada de la invención**

TGF- $\beta$  es una proteína de matriz del hueso abundante que influye en la formación, función, e interacciones entre células de los osteoblastos y osteoclastos, para controlar la remodelación del hueso y mantener una masa ósea adecuada. Como tal, la ruta de señalización de TGF- $\beta$  representa una única diana farmacológica, con el potencial para regular el volumen óseo y la calidad a través del control tanto de osteoblastos como de osteoclastos. Según los estudios anteriores en los que se han utilizado modelos murinos que contenían modificaciones genéticas en la ruta de señalización de TGF- $\beta$ , se ha demostrado que una reducción de la señal de TGF- $\beta$  potencia las propiedades mecánicas y la concentración mineral de la matriz del hueso, así como la masa ósea. Aunque se ha demostrado que los inhibidores de molécula pequeña de la señalización de TGF- $\beta$  disminuyen el crecimiento y la capacidad de invasión del cáncer, el efecto directo del bloqueo de TGF- $\beta$  en el entorno de médula ósea normal en ratones que no son portadores de tumor aún no se ha abordado completamente.

Por lo tanto, los autores de la invención examinaron la capacidad del anticuerpo anti-TGF- $\beta$  para bloquear las rutas de señalización de TGF- $\beta$ . Dicho anticuerpo reguló positivamente el número de osteoblastos al mismo tiempo que disminuyó simultáneamente la cantidad de osteoclastos activos en la médula. Esto tuvo como resultado un profundo aumento del volumen y calidad del hueso. Estos hallazgos ilustran claramente el potencial de los compuestos que se dirigen específicamente a la ruta de señalización de TGF- $\beta$  *in vivo* e indican un enfoque terapéutico para aumentar la masa y la resistencia del hueso. Estos y otros aspectos de la invención se exponen con detalle a continuación.

**I. Anti-TGF- $\beta$** **A. TGF- $\beta$** 

El factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) controla la proliferación, la diferenciación celular y otras funciones de la mayoría de las células. Desempeña un papel en la inmunidad, el cáncer, las enfermedades cardíacas, la diabetes y el síndrome de Marfan. TGF- $\beta$  actúa como factor antiproliferativo en células epiteliales normales y en las primeras fases de oncogénesis. Algunas células secretan TGF- $\beta$  y también tienen receptores para TGF- $\beta$ . Esto es lo que se conoce como señalización autocrina. Las células cancerosas aumentan su producción de TGF- $\beta$ , que actúan también como células circundantes.

TGF- $\beta$  es una proteína secretada que existe en tres isoformas denominadas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Fue el nombre original para TGF- $\beta$ 1, que fue el miembro fundador de esta familia. La familia TGF- $\beta$  forma parte de una

superfamilia de proteínas conocidas como superfamilia de factor de crecimiento transformador beta que incluye inhibinas, activina, hormona anti-mülleriana, proteína morfogenética ósea, decapentaplégico y Vg-1.

Las estructuras de péptido de los tres miembros de la familia TGF- $\beta$  son altamente similares. Todos ellos están codificados como precursores de proteína grande; TGF- $\beta$ 1 contiene 390 aminoácidos y TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 contienen cada uno 412 aminoácidos. Todos ellos tienen un péptido de señal N-terminal de 20-30 aminoácidos y requieren secreción desde una célula, una pro-región (denominada péptido asociado a latencia o LAP y una región C-terminal de 112-114 aminoácidos que se convierte en la molécula TGF- $\beta$  madura tras su liberación de la pro-región por escisión proteolítica. La proteína TGF- $\beta$  madura dimeriza para producir una molécula activa de 25 KDa con muchos motivos estructurales conservados. TGF- $\beta$  tiene nueve restos de cisteína que se conservan entre su familia; ocho forman enlaces disulfuro dentro de la molécula para crear una estructura de nudos de cisteína característica de la superfamilia TGF- $\beta$ , mientras que la novena cisteína forma un enlace con la novena cisteína de otra molécula TGF- $\beta$  para producir el dímero. Se cree que muchos otros restos conservados en TGF- $\beta$  forman una estructura secundaria a través de interacciones hidrófobas. La región entre la quinta y sexta cisteína conservada aloja el área más divergente de las moléculas de TGF- $\beta$  que se expone en la superficie de la molécula y está implicada en la unión a receptor y la especificidad de TGF- $\beta$ .

La apoptosis induce TGF- $\beta$  en numerosos tipos de células. TGF- $\beta$  puede inducir apoptosis de dos maneras: a través de la ruta SMAD o a través de la ruta DAXX. La ruta SMAD es la ruta de señalización canónica a través de la que señalizan los miembros de la familia TGF- $\beta$ . En esta ruta, los dímeros TGF- $\beta$  se unen a un tipo II de receptor que recluta y fosforila un receptor tipo I. El receptor tipo I recluta entonces y fosforila un receptor SMAD regulado (R-SMAD): SMAD3, se ha implicado un RSMAD en la inducción de apoptosis. El R-SMAD se une entonces al SMAD común (coSMAD) SMAD4 y forma un complejo heterodimérico. Este complejo entra entonces en el núcleo de la célula donde actúa como factor de transcripción para varios genes, incluyendo aquellos que activan la ruta proteína quinasa 8 activada con mitógeno que desencadena apoptosis. TGF- $\beta$  también puede desencadenar apoptosis a través de la proteína 6 asociada a muerte (proteína adaptador DAXX). Se ha demostrado que DAXX está asociada y se une al quinasa de receptor de TGF- $\beta$  tipo II. Se cree que TGF- $\beta$  es importante en la regulación del sistema inmune por regulador CD25<sup>+</sup>. Parece ser que TGF- $\beta$  bloquea la activación de linfocitos y fagocitos derivados de monocitos.

## B. Anticuerpos

**Procedimientos de producción.** En otro aspecto, la presente invención contempla un anticuerpo que es inmunorreactivo con TGF- $\beta$ , que incluye su reticulación cruzada con isoformas 1-3 de TGF- $\beta$ . El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, y se desvela como otro aspecto más la preparación de un anticuerpo policlonal con la misma especificidad de TGF- $\beta$ 1-3. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos es muy conocida en la técnica (véase p.ej., Harlow and Lane, 1988).

Brevemente, se prepararon anticuerpos policlonales inmunizando un animal con un inmunógeno (es decir, TGF- $\beta$  o un fragmento el mismo) y recogiendo antisueros de dicho animal inmunizado. Se puede emplear una amplia gama de especies de animales para la producción de antisueros. Normalmente, un animal utilizado para la producción de antisueros es un animal no humano, incluyendo conejos, ratones, ratas, hámsters, cerdos y caballos. Dado el volumen de sangre relativamente grande de los conejos, una opción preferente es un conejo para la producción de anticuerpos policlonales.

Tal como se conoce en la técnica, una composición dada puede variar en cuanto a su inmunogenicidad. Suele ser necesario por tanto estimular el sistema inmunitario huésped, tal como es posible conseguir acoplado un inmunógeno de péptido o polipéptido con un vehículo. Entre los ejemplos de vehículos preferentes se incluyen hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). Pueden emplearse otras albúminas como ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón y albúmina de suero de conejo como vehículos. Los medios para conjugar un polipéptido a una proteína vehículo son muy conocidos en la técnica e incluyen glutaraldehído, éster maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

Tal como se conoce también en la técnica, la inmunogenicidad de una composición de inmunógeno en particular puede potenciarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Entre los ejemplos de adyuvantes preferentes se incluyen adyuvante de Freund completo (un estimulador no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* desactivada), adyuvante de Freund incompleto y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La cantidad de composición de inmunógeno utilizada en la producción de anticuerpos policlonales varía según la naturaleza del inmunógeno así como el animal utilizado para inmunización. Es posible emplear diversas rutas para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). Puede llevarse a cabo un seguimiento de la producción de anticuerpos policlonales extrayendo muestras de sangre del animal inmunizado en diversos puntos temporales tras la inmunización. Se puede proporcionar también una segunda inyección de refuerzo. El proceso de estimulación y titulación se repite hasta conseguir una titulación adecuada. Cuando se obtiene un nivel de inmunogenicidad deseado, se puede desangrar al animal inmunizado y aislar el suero para almacenarlo y/o se puede utilizar el animal para generar mAb.

Los mAb pueden prepararse fácilmente aplicando técnicas muy conocidas, tal como se ilustra en la patente estadounidense 4.196.265. Normalmente, esta técnica implica la inmunización de un animal adecuado con una composición de inmunógeno seleccionada, es decir, una proteína, polipéptido o péptido de TGF- $\beta$  purificado o parcialmente purificado o una célula que exprese altos niveles de TGF- $\beta$ . Se administra la composición de inmunización de manera eficaz para estimular células que producen anticuerpo. Los roedores, como los ratones y las ratas, son animales preferentes, sin bien, el uso de células de conejo, ovejas, ranas, también es posible. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas (Goding, 1986), pero los ratones son preferentes, siendo lo más preferente ratones BALB/c ya que es el más utilizado como rutina y por lo general proporciona un porcentaje superior de fusiones estables.

Tras la inmunización, se seleccionan para su uso células somáticas con el potencial para producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B), en el protocolo de generación de mAb. Estas células pueden obtenerse de bazo biopsiados, anginas o ganglios linfáticos o de una muestra de sangre periférica. Las células del bazo y las células de sangre periférica son preferentes, las primeras porque son una rica fuente de células de producción de anticuerpos que están en la fase de plasmablasto en división y las segundas porque la sangre periférica es muy asequible. Generalmente, el panel de animales habrá sido inmunizado y se habrá extirpado el bazo del animal con la mayor titulación de anticuerpo y se habrán obtenido los linfocitos del bazo por homogeneización del bazo con una jeringuilla. Normalmente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente  $5 \times 10^7$  a  $2 \times 10^8$  linfocitos.

A continuación, se fusionan los linfocitos B que producen anticuerpo del animal inmunizado con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente, una de la misma especie que el animal que se ha inmunizado. Las líneas celulares de mieloma adecuadas para su uso en los procedimientos de fusión de producción de hibridoma son preferentemente aquellas que no producen anticuerpo, que tienen una alta eficiencia de fusión y deficiencias de enzima que hacen que sean incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de solamente las células fusionadas deseadas (hibridomas).

Se puede emplear una cualquiera entre una serie de células de mieloma, todas ellas conocidas entre las personas expertas en la materia (Coding, 1986; Campbell, 1984). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, es posible utilizar P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 and S194/5XX0 Bul; para ratas, es posible utilizar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y se utilizan U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 and UC729-6 en conexión con fusiones de células.

Los procedimientos para generar híbridos de bazo productor de anticuerpos o células de ganglio linfático o células de mieloma comprenden generalmente mezclar células somáticas con células de mieloma en una relación 2:1, si bien la relación puede variar entre aproximadamente 20:1 y aproximadamente 1:1, respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que promueven la fusión de membranas celulares. Geffer y col. (1977) han descrito procedimientos de fusión en los que se utilizan virus Sedai (Kohler and Milstein, 1975; 1976) y en los que se utiliza polietilén glicol (PEG como 37 % (v/v) PEG. El uso de procedimientos de fusión eléctricamente inducidos también es apropiado (Goding, 1986).

Los procedimientos de fusión suelen producir híbridos viables a bajas frecuencias, de alrededor de  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-8}$ . Sin embargo, esto no implica ningún problema, ya que los híbridos fusionados viables se diferencian de las células sin fusionar parentales (en particular, las células de mieloma sin fusionar que normalmente continuarían dividiéndose indefinidamente) por cultivo en un medio selectivo. El medio selectivo es generalmente uno que contiene un agente que bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos en el medio de cultivo de tejido. Entre los ejemplos de agentes preferentes se incluyen aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis *de novo* tanto de purinas como de pirimidinas, mientras que azaserina bloquea solamente la síntesis de purina. Cuando se utilizan aminopterina o metotrexato, se suplementa el medio con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se utiliza azaserina, se suplementa el medio con hipoxantina.

La selección preferente de medio es HAT. Únicamente las células capaces de poner en funcionamiento rutas de salvamento de nucleótidos son capaces de sobrevivir en un medio HAT. Las células de mieloma tienen defecto de enzimas claves de la ruta de salvamento, p.ej., hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) y no pueden sobrevivir. Los linfocitos B pueden poner en funcionamiento esta ruta, pero tienen una duración limitada en cultivo y por lo general mueren en aproximadamente dos semanas. Por lo tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son los híbridos formados de mieloma y de linfocitos B.

Este cultivo proporciona una población de hibridomas de la que se seleccionan hibridomas específicos. Normalmente, la selección de hibridomas se realiza por cultivo de las células con una dilución de un solo clon en placas de microtitulación, seguido del análisis de sobrenadantes clónicos individuales (al cabo de aproximadamente dos a tres semanas) para la reactividad deseada. El ensayo deberá ser sensible, sencillo y rápido, como por ejemplo radioinmunoensayos, inmunoensayos de enzima, ensayos de citotoxicidad, ensayos de placa, ensayos de inmunoglobulina de puntos y similares.

Los hibridomas seleccionados se diluirían entonces en serie y se clonarían en líneas celulares de producción de anticuerpo individuales, pudiéndose propagar dichos clones indefinidamente para proporcionar mAb. Las líneas celulares pueden explotarse para la producción de mAb de dos maneras diferentes. Se puede inyectar una muestra

del hibridoma (a menudo en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se utiliza para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que segregan el anticuerpo monoclonal específico producido mediante el híbrido celular fusionado. Los fluidos corporales del animal, como el suero o fluido de ascitis, pueden aprovecharse para proporcionar mAb en una alta concentración. Las líneas celulares individuales también podrían cultivarse *in vitro*, cuando los mAb se secretan de forma natural en el medio de cultivo del que se pueden obtener después fácilmente en altas concentraciones. Los mAb producidos a través cualquiera de estos métodos pueden purificarse posteriormente, si se desea, por filtración, centrifugación y diversos procedimientos cromatográficos como HPLC o cromatografía de afinidad.

**Anticuerpos modificados.** Se desvelan también moléculas de anticuerpo que comprenden fragmentos (como (F(ab')<sub>2</sub>), F(ab')<sub>2</sub>) que se producen por ejemplo por escisión proteolítica de mAb o inmunoglobulinas monocatenarias producibles por ejemplo por medios recombinantes. Dichos derivados de anticuerpo son monovalentes. En un aspecto, dichos fragmentos pueden combinarse entre sí o con otros fragmentos de anticuerpo o ligandos de receptor para formar moléculas de unión "quiméricas". Cabe destacar que dichas moléculas quiméricas pueden contener sustituyentes capaces de unirse a diferentes epítopos de la misma molécula.

Es posible que sea deseable "humanizar" anticuerpos producidos en hospedadores no humanos con el fin de atenuar una reacción inmunitaria cuando se utilizan en terapia humana. Dichos anticuerpos humanizados se pueden estudiar en un contexto *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos humanizados pueden producirse por ejemplo sustituyendo una porción inmunogénica de un anticuerpo por una porción correspondiente pero no inmunogénica (es decir, anticuerpos quiméricos). Solicitud PCT PCT/US86/02269; solicitud EP 184.187; Solicitud EP 171.496; Solicitud EP 173.494; Solicitud PCT WO 86/01533; Solicitud EP 125.023; Sun y col. (1987); Wood y col. (1985); y Shaw y col. (1988). Morrison (1985; "Humanized" antibodies can alternatively be produced by CDR or CEA substitution. Jones y col. (1986); Verhoeyan y col. (1988); Beidler y col. (1988) proporcionan revisiones generales de anticuerpos quiméricos "humanizados"

En realizaciones más específicas, es posible utilizar las regiones CDR del anticuerpo 1D11 y colocarlas en regiones marco de cualquier otro anticuerpo adecuado, humano o no humano. El anticuerpo anti-TGF- $\beta$  1D11 es un anticuerpo monoclonal murino producido por el hibridoma 1D11.16 (Designación de depósito ATCC No. HB 9849, también descrito en las patentes estadounidenses 5.571.714, 5.772.998 y 5.783.185). El anticuerpo 1D11 se une específicamente a las tres isoformas de mamífero de TGF- $\beta$ . La secuencia de la región variable de cadena pesada de D11 está disponible con el No. de acceso No. AAB46787.

En las realizaciones relacionadas, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  es un derivado de 1D11, p.ej., un anticuerpo que comprende las secuencias CDR idénticas a las de 1D11 (p.ej., un anticuerpo quimérico, humanizado o con injerto de CDR). En otra realización más, el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  es un anticuerpo recombinante completamente humano.

## II. Estructura y fisiología ósea

El hueso es un tejido vivo en crecimiento. Es poroso y está mineralizado y compuesto por células, vasos, matriz orgánica y cristales de hidroxiapatita inorgánicos. El esqueleto humano se compone realmente de 2 tipos de huesos: el hueso cortical y el hueso trabecular. El hueso cortical representa cerca del 80 % de la masa esquelética. El hueso cortical tiene una velocidad de renovación lenta y una alta resistencia a la flexión y la torsión. Proporciona resistencia cuando no es deseable la flexión como es el caso de los huesos largos y medios. El hueso trabecular solamente representa el 20 % de la masa esquelética pero el 80 % de la superficie del hueso. Es menos denso, más elástico y tiene una velocidad de renovación mayor que el hueso cortical.

### A. Células de formación de hueso

**Osteoprogenitores.** Las células precursoras de hueso humano se caracterizan como células de pequeño tamaño que expresan bajas cantidades de proteínas óseas (osteocalcina, osteonectina y fosfatasa alcalina) y tienen un bajo grado de complejidad interna (Long y col., 1995). Cuando se estimulan para diferenciarse, estas células pre-osteoblasto se convierten en osteoblastos en su aspecto, tamaño, expresión antigénica y estructura interna. Si bien estas células están presentes normalmente a frecuencias muy bajas en la médula ósea, se ha descrito un proceso para aislar estas células (Long y col., 1995). La patente estadounidense 5.972.703 describe además procedimientos de aislamiento y uso de células precursoras de hueso.

Una serie de estudios indica que las células derivadas de médula ósea tienen potencial osteogénico. La mayoría de estas investigaciones apuntan a las células madre mesenquimales (MSC) cuando experimentan la diferenciación en osteoblastos cuando se cultivan en presencia de citoquinas activas para el hueso (Jaiswal y col., 2000; Phinney y col., 1999; Aubin, 1998; Zohar y col., 1997). Las células madre mesenquimales son una población pluripotente capaz de generar múltiples linajes de células estromicas. Las MSC, tal como se emplean actualmente, constituyen una población heterogénea de células aisladas por adherencia plástica, o propagadas por paso de baja densidad. No obstante, una publicación reciente indica la naturaleza clónica de los resultados destino de las células en MSC lo cual indica que una sola célula MSC puede dar lugar a dos o tres linajes mesenquimales, siendo uno de ellos normalmente células óseas (Pittenger y col., 1999). Estos estudios están en consonancia con informes anteriores en los que se demuestra el potencial osteogénico de células estromicas de la médula ósea, en particular, las llamadas



UFC-f de ratones y seres humanos (Friedenstein y col., 1968; Reddi and Huggins, 1972; Friedenstein y col., 1982; Ashton y col., 1985; Bleiberg, 1985; Gronthos y col., 1994; Gronthos y col., 1999).

5 El aislamiento de una sola célula de MSC humana generó clones que expresan el mismo fenotipo superficial que MSC sin fraccionar (Pittenger y col., 1999). Cabe destacar que de 6 clones de MSC evaluados, 2 retuvieron el potencial osteogénico, condrogénico y adipogénico; otros fueron bipotentes (potencial osteo- más condrogénico o potencial osteo-adipocítico) o fueron de un solo linaje (condrocito). Esto indica que las propias MSC son heterogéneas por naturaleza (si bien las condiciones de cultivo también pueden haber conducido a una pérdida de potencial de linaje). Hasta la fecha, la capacidad de auto-renovación de MSC sigue siendo un interrogante. No obstante, estos estudios *in vitro* y otros estudios *in vivo* (Kadiyala y col., 1997; Petite y col., 2000; Krebsbach y col., 10 1999) demuestran que MSC puede comprometerse con el linaje de la célula ósea y desarrollar el estado de mineralización de la matriz *in vitro* o la formación *in vivo*.

**Preosteoblastos.** Los preosteoblastos son intermediarios entre las células osteoprogenitoras y los osteoblastos. Presentan una mayor expresión de marcadores fenotípicos del hueso como fosfatasa alcalina (Kale y col., 2000). Tienen una capacidad de proliferación más limitada, pero continúan dividiéndose no obstante y producen más preosteoblastos u osteoblastos. 15

**Osteoblastos.** Un osteoblasto es una célula mononucleada que es responsable de la formación del hueso. Los osteoblastos producen osteoide, que está compuesto principalmente de colágeno de Tipo I. Los osteoblastos también son responsables de la mineralización de la matriz osteoide. El hueso es un tejido dinámico que está siendo remodelado constantemente por los osteoblastos, que construyen el hueso y los osteoclastos, que reabsorben el hueso. Las células osteoblastos tienden a disminuir en número y actividad a medida que los individuos se hacen mayores, disminuyendo así la renovación natural del tejido óseo. 20

Los osteoblastos surgen de células osteoprogenitoras localizadas en el periostio y la médula ósea. Los osteoprogenitores son células progenitoras inmaduras que expresan el factor de transcripción reguladora maestro Cbfa1/Runx2. Osteoprogenitores son inducidos para diferenciarse bajo la influencia de los factores de crecimiento, en particular, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Aparte de las BMP, hay otros factores del crecimiento, entre los que se incluyen el factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de transformación  $\beta$ (TGF- $\beta$ ), que pueden promover la división de osteoprogenitores y aumentar potencialmente la osteogénesis. Una vez que los osteoprogenitores comienzan a diferenciarse en osteoblastos, empiezan a expresar una gama de marcadores genéticos entre los que se incluyen Osterix, Coll, ALP, osteocalcina, osteopontina y osteonectina. Si bien el término osteoblasto implica un tipo de célula inmadura, los osteoblastos son de hecho las células óseas maduras completamente responsables de la generación del tejido óseo en animales y seres humanos. 25 30

**Osteoclastos.** Un osteoclasto es un tipo de célula ósea que elimina el tejido óseo al eliminar su matriz mineralizada. Este proceso es lo que se conoce como resorción ósea. Los osteoclastos y osteoblastos sirven como instrumento para controlar la cantidad de tejido óseo: los osteoblastos forman hueso, los osteoclastos reabsorben el hueso. Los osteoclastos se forman por fusión de células del linaje de células de monocito-macrófago. Los osteoclastos se caracterizan por una alta expresión de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) y catepsina K. 35

La formación de osteoclasto requiere la presencia de ligando RANK (activador de receptor de factor nuclear  $\kappa\beta$ ) y MCSF (factor estimulador de colonia de macrófago). Estas proteínas de unión a membrana se producen aproximando células estrómicas y osteoblastos; reduciendo así el contacto directo entre estas células y precursores de osteoclasto. M-CSF actúa a través de su receptor en el osteoclasto, c-fms (receptor de receptor 1 de estimulación de colonia), un receptor de tirosina quinasa de transmembrana, que conduce a una activación de mensajero de secuencia de tirosina quinasa Src. Ambas moléculas son necesarias para la osteoclastogénesis y están muy relacionadas con la diferenciación de células derivadas de monocito/macrófago. RANKL es un miembro de la familia de necrosis de tumor (TNF) y es esencial en la osteoclastogénesis. Los ratones en los que se ha inactivado RANKL presentan un fenotipo de osteopetrosis y defectos de erupción de los dientes, junto con la ausencia o deficiencia de osteoclastos. RANKL activa NF- $\kappa\beta$  (factor- $\kappa\beta$  nuclear) y NFATc1 (factor nuclear de linfocito T activado, citoplásmicas, dependientes de calcineurina 1) a través de RANK. La activación de NF- $\kappa\beta$  se estimula prácticamente de forma inmediata una vez que tiene lugar la interacción RANKL-RANK y no está regulada al alza. La estimulación de NFATc1, sin embargo, comienza ~24-48 horas después de que tenga lugar la unión y se ha demostrado que su expresión depende de RANKL. La diferenciación de osteoclastos es inhibida por osteoprotegerina (OPG), que se une a RANK con lo cual se previene la interacción con RANK. 40 45 50

## B. Formación de hueso

La formación de hueso durante la fase fetal del desarrollo tiene lugar a través de dos procesos: osificación intramembranosa y osificación endocondral. La osificación intramembranosa tiene lugar principalmente durante la formación de los huesos planos del cráneo; el hueso se forma a partir de tejido mesenquimal. Las fases de la osificación intramembranosa son el desarrollo desde el centro de osificación, calcificación, formación de trabéculas y desarrollo de periostio. La osificación endocondral por otra parte tiene lugar en los huesos largos, como las extremidades; el hueso se forma alrededor de una matriz de cartílago. Las fases de la osificación endocondral son el 55

desarrollo del modelo de cartilago, crecimiento de cartilago, desarrollo del centro de osificación primaria y desarrollo del centro de osificación secundaria.

La osificación endocondral empieza con puntos en el cartilago denominados "centros de osificación primaria". La mayoría aparece durante el desarrollo fetal, si bien algunos huesos cortos comienzan su osificación primaria tras el nacimiento. Son responsables de la formación de diafisis de huesos largos, huesos cortos y ciertas partes de los huesos irregulares. La osificación secundaria tiene lugar tras el nacimiento y forma las epífisis de los huesos largos y las extremidades de los huesos irregulares y planos. La diáfisis y ambas epífisis de un hueso largo se paran mediante una zona de crecimiento de cartilago (la placa epifisaria). Cuando el niño alcanza la madurez esquelética (18 a 25 años de edad), todos los cartilagos se reemplazan por huesos, fusionándose la diáfisis y ambas epífisis (cierre epifisario).

La remodelación o renovación del hueso es un proceso de resorción seguido del reemplazamiento de hueso con un pequeño cambio de la forma y tiene lugar a lo largo de la vida de la persona. Los osteoblastos y osteoclastos acoplados entre sí a través de la señalización de célula paracrina reciben el nombre de unidades de remodelación del hueso. El propósito de remodelación es regular la homeostasis de calcio, reparar los huesos dañados micrométricamente (de la tensión diaria) pero también modelar y esculpir el esqueleto durante el crecimiento.

El proceso de resorción ósea mediante los osteoclastos libera el calcio almacenado en la circulación sistémica y es un importante proceso en la regulación del equilibrio del calcio. A medida que el calcio en circulación fija activamente la formación del hueso en su forma mineral, retirándose de la corriente sanguínea, la resorción la desfija activamente aumentando así los niveles de calcio en la circulación. Estos procesos tienen lugar en tándem en localizaciones específicas de sitio.

El esfuerzo repetido, como pueda ser el ejercicio de soportar peso o la curación del hueso, tiene como resultado el espesamiento del hueso en puntos de máxima tensión (ley de Wolff). Se ha lanzado la hipótesis de que esto se deriva de las propiedades piezoeléctricas del hueso, que hacen que el hueso genere pequeños potenciales eléctricos ante el esfuerzo.

### III. Tratamientos

#### A. Enfermedades y afecciones óseas

Existen infinidad de afecciones que se caracterizan por la necesidad de mejorar la formación de hueso de inhibir la resorción ósea y por tanto, se podrían beneficiar del uso de anticuerpo anti-TGF- $\beta$  o combinaciones de anticuerpos anti-TGF- $\beta$  y agentes secundarios, tal como se ha descrito, o células tratadas con ellos para promover la formación de hueso y/o la reparación ósea. Tal vez el más evidente es el caso de las fracturas de hueso, en las que sería deseable estimular el crecimiento óseo o acelerarlo y completar la reparación del hueso. Los agentes que potencian la formación del hueso serían también útiles en procedimientos de reconstrucción facial. Otras afecciones de déficit óseo incluyen defectos segmentales óseos, enfermedad periodontal, enfermedad ósea metastásica, enfermedad ósea osteolítica y afecciones en las que la reparación del tejido conectivo sería beneficiosa, como por ejemplo curado y regeneración de los defectos o lesión del cartilago. Asimismo, reviste gran importancia el estado crónico de osteoporosis, que incluye osteoporosis relacionada con la edad y osteoporosis asociada con el estado hormonal post-menopáusico. Otras afecciones caracterizadas por la necesidad de crecimiento óseo incluyen hiperparatiroidismo primario y secundario, osteoporosis por desuso, osteoporosis relacionada con diabetes y osteoporosis relacionada con glucocorticoides. Existen otras afecciones diversas, como por ejemplo deficiencia de vitamina D.

**Fractura.** El primer ejemplo es el individuo que, por lo demás estaría sano, padece una fractura. A menudo, la fractura de hueso clínica se trata escayolando para aliviar el dolor y permitir que los mecanismos de reparación natural reparen la herida. Ha habido avances en el tratamiento de fracturas en los últimos tiempos, sin embargo, incluso sin considerar las distintas complicaciones que puedan surgir en el tratamiento de huesos fracturados, cualquier nuevo procedimiento para aumentar la curación del hueso en circunstancias normales representaría un gran avance.

**Enfermedad periodontal.** La enfermedad periodontal progresiva conduce a una pérdida del diente a través de la destrucción de la fijación al diente con el hueso circundante. Aproximadamente 5-10 % de la población de Estados Unidos (15-60 millones de individuos) padece de enfermedad periodontal generalizada severa y existen 2 millones de procedimientos quirúrgicos relacionados. Por otra parte, si esta enfermedad se define como la identificación de al menos un sitio de pérdida de fijación clínica, entonces aproximadamente 80 % de todos los adultos están afectados y 90 % de ellos tienen edades de 55 a 64 años. Si no se trata, un 88 % de los individuos afectados presentan una progresión moderada a rápida de la enfermedad que presenta una fuerte correlación con la edad. El principal tratamiento actual de las enfermedades periodontal es la terapia regenerativa que consiste en el reemplazamiento de los tejidos periodontales perdidos. El hueso perdido suele tratarse con el hueso y la médula ósea del propio individuo debido a su alto potencial osteogénico. Los aloinjertos de hueso (entre individuos) también pueden llevarse a cabo utilizando hueso humano almacenado. Aunque los análisis del coste periodontal actuales son difíciles de obtener, el tamaño de la población afectada y el uso actual de los injertos de hueso como terapia de primer orden

indican sólidamente que esta área representa un atractivo objetivo de las terapias de construcción de hueso.

**Osteopenia/osteoporosis.** Los términos osteopenia y osteoporosis se refieren a un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por una disminución de la masa ósea y fracturas. La osteopenia es una masa ósea que tiene una desviación típica de uno o más por debajo de la masa del hueso media para una población; la osteoporosis se define como 2,5 SD o inferior. Una población estimada de 20-25 millones de personas se encuentran en un mayor riesgo de fractura debido a la pérdida de hueso específica de sitio. Los factores de riesgo para osteoporosis incluyen la edad avanzada, el género (más casos en mujeres), baja masa ósea, menopausia precoz, raza (los caucásicos en general; mujeres asiáticas e hispánicas), bajo consumo de calcio, actividad física reducida, factores genéticos, factores ambientales (incluyendo, consumo de tabaco y abuso de alcohol o cafeína) y deficiencias en el control neuromuscular que crean propensión a las caídas.

Más de un millón de fracturas en los Estados Unidos cada año pueden atribuirse a osteoporosis. En términos económicos, el coste (exclusivamente por los salarios perdidos) por terapias de osteoporosis asciende a 35.000 millones de dólares americanos en todo el mundo. La tendencia demográfica (es decir, el aumento gradual de la edad en la población estadounidense) indica que estos costes pueden aumentar a 62.000 millones de dólares americanos para el año 2020. Claramente, la osteoporosis es un problema sanitario importante.

La osteoporosis, una vez considerada como parte natural del envejecimiento entre las mujeres, deja de considerarse como algo que depende de la edad y del género. La osteoporosis se define como un trastorno del esqueleto caracterizado por una predisposición a que la resistencia del hueso esté comprometida para un mayor riesgo de fractura. La resistencia del hueso refleja la integración de dos características principales: la densidad del hueso y la calidad del hueso. La densidad del hueso se expresa como gramos de mineral por área o volumen y se determina en un individuo dado por la masa ósea máxima y la cantidad de pérdida ósea. La calidad ósea se refiere a la arquitectura, renovación, acumulación de daños (p.ej., microfracturas) y mineralización. Una fractura tiene lugar cuando se aplica una fuerza de inducción a la fractura (p.ej., traumatismo) sobre el hueso osteoporótico.

Las terapias actuales para los pacientes con osteoporosis se centran en la prevención de fracturas, no en promover la formación de hueso o la reparación de la fractura. Esto sigue siendo una consideración importante por la bibliografía, que señala de forma clara que la morbilidad y mortalidad están asociadas con un encamado prolongado en las personas de edad, en particular, aquellas que han padecido fracturas de cadera. Las complicaciones que se derivan del encamado incluyen coágulos de sangre y neumonía. Estas complicaciones están reconocidas y por lo general se adoptan medidas para evitarlas, si bien apenas es el enfoque de terapia mejor. Por lo tanto, la población de pacientes osteoporóticos se beneficiaría de las nuevas terapias diseñadas para fortalecer los huesos y acelerar el proceso de reparación de fracturas, procurando que estas personas se levanten antes de que surjan dichas complicaciones.

**Reconstrucción ósea/injertos.** Un cuarto ejemplo se refiere a la construcción del hueso y, específicamente, la capacidad para reconstruir defectos en el tejido óseo que es el resultado de lesión traumática; como consecuencia de cáncer o cirugía para el cáncer; como resultado de un defecto congénito, o como resultado de la edad. Existe una significativa necesidad de implantes ortopédicos más frecuentes y los huesos craneal y facial son dianas en particular para este tipo de necesidad de reconstrucción. La disponibilidad de nuevos materiales de implante, p.ej., titanio ha permitido la reparación de defectos relativamente grandes. Los implantes de titanio proporcionan una excelente estabilidad temporal a través los defectos óseos. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que la falta de un hueso viable que subsane el defecto puede tener como resultado la exposición del aparato, infección, inestabilidad estructural y, finalmente, fracaso en la reparación del defecto. Por tanto, un agente terapéutico que estimule la formación de hueso en el implante o alrededor de él facilitará la más rápida recuperación.

Los injertos óseos autólogos son otra posibilidad para tratar las lesiones óseas, pero se ha demostrado que presentan varias desventajas ya que deben recogerse del sitio de un donante como la cresta ilíaca o la costilla, no suelen proporcionar el hueso suficiente para completar el rellenado del defecto y el hueso que se forma tiende a veces a la infección y la resorción. Las preparaciones xenogéneas parcialmente purificadas no son prácticas para su uso clínico ya que se purifican cantidades en microgramos desde kilogramos de hueso bovino, de manera que la producción comercial a gran escala resulta costosa e impracticable. Por tanto, generalmente se emplean aloinjertos y preparaciones de hueso desmineralizado, pero adolecen de su naturaleza desvitalizada y de que solamente funcionan como andamios para crecimiento de célula ósea endógena.

Las transferencias microquirúrgicas de injertos óseos libres con tejido blando y vasos sanguíneos fijados pueden cerrar los defectos del hueso con una fuente inmediata de suministrar sangre al injerto. Sin embargo, estas técnicas requieren tiempo y se ha demostrado que producen una gran proporción de morbilidad y que pueden ser utilizados únicamente por individuos entrenados. Por otra parte, el implante de hueso suele estar limitado en cantidad y no se puede contornear fácilmente. En la mandíbula, por ejemplo, la mayoría de los pacientes no pueden llevar aparatos dentales al utilizar las técnicas aceptadas en el momento actual (incluso después de establecer continuidad) y por tanto ganan una escasa mejora en la capacidad para masticar.

En conexión con la reconstrucción de huesos, las áreas problemáticas específicas para su mejora son las que conciernen al tratamiento de defectos grandes, como los creados por un traumatismo, defectos congénitos o,

particularmente, tras la extirpación de un tumor; y también el área de las articulaciones artificiales. El éxito de los implantes ortopédicos, las interfaces y las articulaciones artificiales podría mejorarse concebiblemente en la superficie del implante o una parte funcional de un implante si se revistieran con un agente de estimulación del hueso. La superficie de los implantes podría revestirse con uno o más materiales apropiados con el fin de promover una interacción más eficaz con el sitio biológico que rodea el implante e, idealmente, para promover la reparación del tejido.

**Cáncer de hueso primario y enfermedad de hueso metastásico.** El cáncer de huesos se produce a menudo cuando están presentes metástasis de hueso en una amplia gama de cánceres, incluyendo tiroides, riñón y pulmón. El cáncer de huesos metastásico es una afección crónica; la supervivencia desde el momento del diagnóstico es variable dependiendo del tipo de tumor. En el cáncer de mama y de próstata y en mieloma múltiple, el tiempo de supervivencia se puede medir por años. Para el cáncer de pulmón avanzado, se mide en meses. Entre los síntomas del cáncer se incluye dolor, hipercalcemia, fractura patológica y compresión de la columna vertebral o compresión de los nervios. El pronóstico de cáncer de huesos metastásico está influido por el sitio de tumor primario, la presencia de enfermedad extra-ósea y el grado y ritmo de la enfermedad ósea. La progresión del cáncer/metástasis se determina por análisis con obtención de imágenes y la medición de los marcadores específicos de hueso. Las investigaciones recientes demuestran una fuerte correlación entre la velocidad de resorción ósea y el resultado clínico, tanto en lo que se refiere a la progresión de la enfermedad como el fallecimiento.

**Mieloma múltiple.** El mieloma múltiple (MM) es una malignidad de linfocitos B caracterizada por la acumulación de células plasmáticas clónicas malignas en la médula ósea. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se deben al reemplazamiento de componentes de la médula ósea normales por células de plasma anormales, con la consiguiente sobreproducción de inmunoglobulina monoclonal (proteína M o componente M), destrucción ósea, dolor óseo, anemia, hipercalcemia y disfunción renal.

A diferencia de otros cánceres que se propagan al hueso (p.ej. mama, pulmón, tiroides, riñón, próstata), la enfermedad ósea de mieloma (MBD) no es una enfermedad metastásica, sino que las células de mieloma se derivan de linfocitos B del sistema inmunitario que residen normalmente en la médula ósea y por tanto están íntimamente asociadas con el hueso. De hecho, el entorno de la médula ósea desempeña un importante papel en el crecimiento, supervivencia y resistencia a quimioterapia de las células de mieloma, que a su vez regulan el aumento de la pérdida ósea asociada con este trastorno ([web internacional en multiplemyeloma.org](http://www.internationalmyeloma.org)). Más de un 90 % de los pacientes con mieloma tienen implicación de huesos, frente a 40-60 % de los pacientes con cáncer que tienen metástasis de huesos y más de un 80% tienen dolor de huesos que no se puede tratar. Adicionalmente, aproximadamente un 30% de los pacientes de mieloma tienen hipercalcemia que es el resultado de la mayor actividad osteolítica asociada con esta enfermedad (Cavo y col., 2006).

Los problemas comunes en mieloma son debilidad, confusión y fatiga como consecuencia de la hipercalcemia. Dolor de cabeza, cambios visuales y retinopatía pueden resultar de la hiperviscosidad de la sangre dependiendo de las propiedades de la paraproteína. Finalmente, puede haber dolor radicular, pérdida del control intestinal y de vejiga (debido a la participación de la columna vertebral que lleva a la compresión de la columna) o síndrome de túnel carpal y otras neuropatías (debido a la infiltración de nervios periféricos por amiloides). Puede dar lugar a paraplejía en casos que se presentan tardíos.

**Enfermedad ósea del mieloma.** Tal como se ha explicado, a diferencia de la osteólisis asociada con otros tumores óseos, las lesiones MBD son únicas ya que no se curan o reparan a pesar de que los pacientes lleven años de completa remisión. Mecánicamente, esto parece estar relacionado con la inhibición y/o pérdida de osteoblastos que forman hueso durante la progresión de la enfermedad. De hecho, los estudios de marcador óseo y la histomorfometría indican actividad de osteoblastos y resorción ósea de osteoclastos, pero guardando un equilibrio al principio de la enfermedad, mientras que la MBD abierta presenta una alta actividad de osteoclastos y una baja actividad de osteoblastos. Por tanto, MBD es un trastorno en el que la formación ósea y la pérdida del hueso están descompensadas y que podría beneficiarse de terapias que estimulan la formación del hueso y retardan su pérdida.

Se ha utilizado una serie de enfoques terapéuticos en MBD, con criterios de valoración de tratamiento del dolor, hipercalcemia o reducción de los eventos relacionados con el esqueleto (SRE). Muchos de ellos pueden presentar complicaciones graves. La cirugía, como la vertebroplastia o la cifoplastia, que se realiza para estabilizar y aliviar el dolor conlleva riesgos quirúrgicos (p.ej., infección) que se agravan como consecuencia de un sistema inmunitario comprometido y no revierten los defectos esqueléticos existentes. La terapia por radiación y la terapia de radioisótopo se utilizan ambas para prevenir/controlar la progresión de la enfermedad y presentan los riesgos típicos de las terapias de irradiación. Más recientemente, se han convertido en un patrón de terapia para MBD fármacos como bisfosfonatos que inhiben la actividad de osteoclastos, a pesar del hecho de que funcionan insuficientemente en este trastorno. En 9 pruebas controladas con placebo doble ocultación principales, solamente un 66 % de los pacientes presentaron una reducción eficaz del dolor; 56 % presentaron una reducción en SRE y solamente 1 de cada 9 presentaron un beneficio de supervivencia.

## B. Tratamientos de combinación

Tal como se explica, la presente invención proporciona un tratamiento de enfermedades óseas y traumatismo óseo

estimulando la producción de tejido óseo nuevo. Es posible utilizar otros agentes en combinación con los anticuerpos anti-TGF-β de la presente invención. Más generalmente, estos agentes proporcionan una cantidad combinada (junto con los anticuerpos anti-TGF-β) para producir cualquiera de los efectos que se han explicado. Este proceso puede implicar el contacto de la célula o el sujeto con ambos agentes al mismo tiempo. Esto se puede conseguir poniendo en contacto la célula con una sola composición o formulación farmacéutica que incluye ambos agentes y por contacto de la célula o el sujeto con dos composiciones o formulaciones diferenciadas, al mismo tiempo, en las que una composición incluye el inhibidor intracelular y la otra incluye el segundo agente.

Alternativamente, un agente puede preceder o seguir a otro a intervalos que oscilan entre minutos y semanas. En las realizaciones en las que se aplican los agentes por separado a la célula o al sujeto, generalmente hay que asegurarse de que no ha expirado un período de tiempo significativo entre el momento de cada suministro, de tal manera que los agentes sigan siendo capaces todavía de ejercer el efecto combinado ventajosamente sobre la célula o el sujeto. En tal caso, se contempla la posibilidad de poner en contacto la célula o el sujeto con otras modalidades en el plazo de aproximadamente 12-24 horas entre ellos o más preferentemente, aproximadamente 6-12 horas entre ellos. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, sin embargo, con un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) o varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las correspondientes administraciones.

Pueden emplearse varias combinaciones, el anticuerpo anti-TGF-β es "A" y el otro agente es "B".

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

Los protocolos de administración y la formulación de dichos agentes seguirán por lo general los que son convencionales para fármacos, tal como se explica a continuación. La combinación de agentes incluye bisfosfonatos (Didronel™, Fosamax™ y Actonel™), SERMs (Evista) u otros derivados de hormona y análogos de hormona paratiroide (PTH).

#### IV. Formulaciones farmacéuticas y administración

##### A. Composiciones y rutas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos anti-TGF-β disueltos o dispersados en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o perjudicial cuando se administra a un animal, como por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un anticuerpo anti-TGF-β y, opcionalmente, un principio activo adicional, es conocida entre las personas expertas en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como lo ilustra en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990. Por otra parte, para administración a un animal (p.ej. un ser humano) debe entenderse que las preparaciones deberán satisfacer todas las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridas por la Oficina de Patrones Biológicos de la FDA.

Tal como se emplea en el presente documento "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (p.ej., agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retardación de la absorción, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármaco, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, al igual que los materiales y combinaciones de los mismos, tal como conocerán las personas expertas en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, 1289-1329). Solamente con la excepción de que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

Se puede mezclar el anticuerpo anti-TGF-β con diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se administran oralmente o por inyección. La presente invención se puede administrar por vía bucal, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intratecal, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intramuscular, intratumoral, en la vasculatura del tumor, subcutánea, mucosa, oral, tópica, local, por inhalación (p.ej., inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada por baño de células diana directamente, a través de un catéter, a través de lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (p.ej., nanopartículas, liposomas) o a través de otro procedimiento o cualquier combinación de los mencionados, tal como conocerán las personas expertas en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990). En particular, el anticuerpo anti-TGF-β se formula en una composición para su aplicación en jeringuilla para su uso para administración intravenosa.

El anticuerpo anti-TGF-β puede formularse en una composición en una base libre, neutra o forma de sal o éster. También puede sintetizarse/formularse en una forma de profármaco. Entre las sales farmacéuticamente aceptables

se incluyen sales de adición de ácido, p.ej., las formadas con los grupos amino libres de una composición de proteínas o que están formadas con ácidos inorgánicos, como por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o dichos ácidos orgánicos como ácidos acético, oxálico, tartárico, fumárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libre también pueden derivarse de bases inorgánicas como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína. Tras la formulación, se administrarán las soluciones de manera compatible con la formulación de dosificación en una cantidad tal como para que sea terapéuticamente eficaz.

Además, de acuerdo con la presente invención, se proporciona la composición de la presente invención adecuada para administración en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo deberá ser asimilable e incluye vehículos líquidos, semi-sólidos, es decir pastas, o sólidos. Únicamente a excepción de que el medio convencional, agente, diluyente o vehículo se negativo para el receptor o para la eficacia terapéutica de la composición que lo contiene, su uso en la composición de administración para su uso en la puesta en práctica de los procedimientos de la presente invención es apropiado. Entre los ejemplos de vehículos o diluyentes se incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, cargas y similares o combinaciones de los mismos. La composición puede comprender también varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más de los componentes. Asimismo, la prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante conservantes como por ejemplo varios agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos parabenos (p.ej., metil parabenos o propil parabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, trimerosal o combinaciones de los mismos.

En una realización específica de la presente invención, se combina la composición o se mezcla a fondo con un vehículo semi-sólido o sólido. El mezclado puede llevarse a cabo de cualquier manera convencional, como triturado. Es posible agregar también agentes estabilizadores en el proceso de mezclado para proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, es decir, desnaturalización en el estómago. Entre los ejemplos de estabilizadores para su uso en la composición se incluyen tampones, aminoácidos, como glicina y lisina, hidratos de carbono como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc.

En otras realizaciones más, la presente invención puede referirse al uso de una composición de vehículo lipídico farmacéutico que incluye anticuerpos anti-TGF- $\beta$ , uno o más lípidos y un disolvente acuoso. Tal como se utiliza en el presente documento "lípidos" se define para que incluya cualquiera entre una amplia gama de sustancias que es característicamente insoluble en agua y que se puede extraer con un disolvente orgánico. Esta amplia clase de compuestos es muy conocida entre las personas expertas en la materia y tal como se utiliza en el presente documento el término "lípidos" no está limitado a ninguna estructura en particular. Entre los ejemplos se incluyen compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados. Un lípido puede ser natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Los lípidos se conocen dentro de la técnica e incluyen por ejemplo grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glicolípidos, sulfatidos, lípidos con ácidos grasos unidos a éter y éster y lípidos polimerizables y combinaciones de ellos.

Las personas expertas en la materia estarán familiarizadas con la gama de técnicas que se pueden emplear para dispersar una composición en un vehículo lípido. Por ejemplo, pueden dispersarse anticuerpos anti-TGF- $\beta$  en una solución que contiene un lípido, disolverse con un lípido, emulsionarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente con un lípido, incluirse como suspensión en un lípido, incluirse o formar un complejo con un micelo o un liposoma o asociarse de otro modo con un lípido o una estructura de lípido a través de cualquier medio conocido entre las personas expertas en la materia. La dispersión puede tener o no el resultado de la formación de liposomas.

La cantidad de dosis real de la composición de la presente invención que se administra a un paciente animal puede determinarse según factores físicos y fisiológicos, como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se esté tratando, las intervenciones terapéuticas anteriores o en curso, la idiopatía del paciente y la ruta de administración. Dependiendo de la posología y la ruta de administración, el número de administraciones de una dosificación preferente y/o cantidad eficaz puede variar de acuerdo con la respuesta del sujeto. El facultativo responsable de la administración será en cualquier caso quien determine la concentración del (los) principio(s) activo(s) en la composición y las dosis apropiadas para cada sujeto como individuo.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-TGF- $\beta$  pueden comprender por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 % del antagonista, aproximadamente 0,5 % del antagonista o aproximadamente 1,0 % del antagonista. En otras realizaciones, el antagonista puede comprender entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 75 % del peso de la unidad o entre aproximadamente 25 % y aproximadamente 60 %, por ejemplo y cualquier intervalo que se pueda derivar. Naturalmente, la cantidad del antagonista en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de manera que se obtenga una dosis adecuada de cualquier dosis unitaria del compuesto. Las personas expertas en la especialidad de la preparación dichas formulaciones farmacéuticas contemplarán factores como la solubilidad, la biodisponibilidad, la semivida biológica, la ruta de administración, la caducidad del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, y siendo así pueden ser deseables diversas posologías y pautas de tratamiento.

En otros ejemplos no exhaustivos, una dosis de anticuerpos anti-TGF- $\beta$  puede comprender también de aproximadamente 0,1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 0,2 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 0,5 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 10 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 50 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 100 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 200 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 350 miligramo/kg/peso corporal, aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivable de ellos. En ejemplos no exhaustivos de un intervalo que se puede derivar de los números enumerados en el presente documento, puede administrarse en un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 5 microgramo/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramo/kg/peso corporal, etc., sobre la base de los números descritos.

En realizaciones en particular de la presente invención, los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  se formulan para su administración a través de una ruta de alimentación. Las rutas de alimentación incluyen todas las rutas de administración posibles en las que se pone en contacto la composición directamente con el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento pueden administrarse por vía oral, bucal, rectal o sublingual. Siendo así, dichas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un vehículo compresible asimilable o se pueden encerrar en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda o se pueden comprimir en comprimidos o se pueden incorporar directamente en el alimento de la dieta.

En ciertas realizaciones, los compuestos activos pueden llevar incorporados excipientes y utilizarse en forma de comprimidos para ingerirlos, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares (Mathiowitz y *col.*, 1997; Hwang y *col.*, 1998; patentes estadounidenses 5.641.515, 5.580.579 y 5.792.451). Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también lo siguiente: un aglutinante, como por ejemplo, goma de tragacanto, acacia, gelatina de almidón de maíz o combinaciones de los mismos; un excipiente, como por ejemplo fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, como por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, como por ejemplo estearato de magnesio; un agente edulcorante, como por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante, como por ejemplo pipermint, esencia de gaulteria, aroma de cereza, aroma de naranja, etc. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula puede contener, además de los materiales del tipo mencionado, un vehículo líquido. Pueden estar presentes otros materiales diversos como revestimientos o modificarse de otra forma la forma física de la dosis unitaria. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden ir revestidos con shellac, azúcar o ambos. Cuando la forma de dosificación es una cápsula, puede contener además de los materiales del tipo mencionado, vehículos como un vehículo líquido. Las cápsulas de gelatina, comprimidos o píldoras pueden estar revestidas entéricamente. Los revestimientos entéricos previenen la desnaturalización de la composición en el estómago o el intestino superior cuando el pH es ácido. Véase, p.ej., la patente estadounidense 5.629.001. Una vez que alcanza el intestino delgado, el pH básico en él disuelve el revestimiento y permite que la composición se libere y se absorba a través de células especializadas, p.ej., enterocitos epiteliales y células de las placas de Peyer. Un jarabe de elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante, como por ejemplo sabor a cereza o naranja. Naturalmente, cualquiera de los materiales utilizados para preparar cualquiera de las formas de dosis unitaria será farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Por otra parte, los compuestos activos pueden incorporarse en la preparación o las formulaciones de liberación sostenida.

Para administración oral, como pueda ser el tratamiento de una enfermedad periodontal, las composiciones de la presente invención pueden ir incorporadas alternativamente en uno o más excipientes en forma de enjuagues bucales, dentífricos, comprimidos bucales, pulverizadores orales o formulaciones para administración sublingual oralmente. Por ejemplo, un enjuague bucal puede prepararse incorporando el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, como solución de borato sódico (solución de Dobell's). Alternativamente, se puede incorporar el principio activo en una solución oral, por ejemplo aquella que contiene borato sódico, glicerina y bicarbonato potásico, o dispersarse en un dentífrico o añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes de formación de espuma y humectantes. Alternativamente, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos, gel o solución para colocarse en la lengua, en la encía, servir para cepillar las superficies dentales o disolverse en la boca. Las patentes estadounidenses 6.074.674 y 6.270.750 describen composiciones de liberación sostenida, tópica para procedimientos periodontales.

En otras realizaciones, los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  pueden administrarse a través de una ruta parenteral. Tal como se emplea en el presente documento, el término "parenteral" incluye rutas que esquivan el tracto alimentario. Específicamente, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden administrarse por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraarterial, intratecal,

subcutánea o intraperitoneal. Patentes estadounidenses 6.537.514, 6.613.308, 5.466.468, 5.543.158; 5.641.515; y 5.399.363. Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar en agua convenientemente mezclada con un tensioactivo, como hidroxipropil celulosa. Las dispersiones se pueden preparar en glicerol, polietilen glicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente estadounidense 5.466.468). En todos los casos, la forma puede ser estéril y puede ser fluida hasta el punto de ser fácilmente inyectable. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio de dispersión o disolvente que contiene por ejemplo agua, etanol, poliol (es decir, glicerol, propilen glicol y polietilen glicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse por ejemplo mediante el uso de un revestimiento, como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, trimerosal y similares. En muchos casos puede ser deseable incluir agentes isotónicos, como por ejemplo azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso de composiciones de agentes que retrasan la absorción, como por ejemplo monoestearato de magnesio y gelatina.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, se deberá tamponar la solución convenientemente si es necesario y hacer el diluyente líquido primero isotónico con suficiente solución salina o glicosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, el medio acuoso estéril que se puede emplear será conocido entre las personas expertas en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede disolver una dosis en 1 ml de solución NaCl isotónica y añadirla a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 and 1570-1580). Será necesaria alguna variación en la dosificación dependiendo de las condiciones del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración, determinará en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto como individuo. Por otra parte, para administración humana las preparaciones deberán satisfacer las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad en general y pureza, tal como lo requiere la Oficina de Normas biológicas de la FDA.

Las formulaciones de liberación sostenida para el tratamiento de afecciones óseas incluyen las descritas en las patentes estadounidenses 4.722.948, 4.843.112, 4.975.526, 5.085.861, 5.162.114, 5.741.796 y 6.936.270. Los procedimientos y las composiciones inyectables para reparación ósea se describen en las patentes estadounidenses 4.863.732, 5.531.791, 5.840.290, 6.281.195, 6.288.043, 6.485.754, 6.662.805 y 7.008.433.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. En general, se preparan las dispersiones incorporando los distintos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios entre los enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferentes para la preparación son secado al vacío y criodesecación que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada para su esterilización previamente. Se combina una composición con un vehículo líquido como, p.ej., agua o solución salina, con o sin un agente estabilizante.

## B. Dispositivos

Además de proporcionar anticuerpos anti-TGF- $\beta$  para su administración a través de las rutas explicadas, dichos agentes, ya sean solos o en combinación, pueden utilizarse en el contexto de aparatos, como por ejemplo implantes. Se contemplan diversos implantes relacionados con los huesos, incluyendo implantes dentales, implantes para articulaciones, como caderas, rodillas y codos, implantes para las vértebras/columna vertebral y otros. Los anticuerpos anti-TGF- $\beta$  se pueden impregnar en una superficie del implante, incluyendo una matriz bioactiva o revestimiento. El inhibidor puede formularse además en un tiempo de liberación sostenido, retardado o prolongado. El revestimiento puede comprender polímeros, por ejemplo, los que se enumeran a continuación. A continuación, se cita una lista de patentes que se refieren a implantes óseos y dispositivos que se pueden utilizar de acuerdo con esta realización de la invención:

### TABLA 1 – PATENTES DE IMPLANTES ÓSEOS

Patente EE. UU.	Título de patente
7.044.972	Implante óseo, en particular, un implante intervertebral
7.022.137	Implante de fusión intervertebral hemilumbar óseo que tiene un extremo de avance



## ES 2 702 049 T3

		asimétrico y procedimiento para su instalación
	7.001.551	Procedimiento de formación de un implante de material óseo compuesto
	6.994.726	Implante óseo prostético de función dual y procedimiento para su preparación
5	6.989.031	Implante semi-intervertebral fabricado a partir de anillo óseo largo principal o un compuesto óseo
	6.988.015	Implante óseo
	6.981.975	Procedimiento para insertar un implante de fusión vertebral que tiene proyecciones de enganche en el hueso desplegables.
10	6.981.872	Procedimiento de implante óseo para implantar y kit para su uso en la fabricación de implantes, en particular, útiles en lo que se refiere a implantes dentales.
	6.929.662	Elemento extremo para un implante de fusión ósea
	6.923.830	Implante de fusión vertebral que tiene proyecciones de enganche del hueso desplegables
	6.921.264	Implante para su implantación en el tejido óseo o en el tejido óseo suplementado con un material sustituto del hueso
15	6.918.766	Procedimiento, disposición y uso de un implante para asegurar el suministro de una sustancia bioactiva al hueso y/o al tejido que rodea el implante
	6.913.621	Implante flexible con el uso de hueso parcialmente desmineralizado
	6.899.734	Implante modular para fusionar una estructura ósea adyacente
	6.860.884	Implante para conector del hueso
20	6.852.129	Implante de fusión ósea ajustable y procedimiento
	6.802.845	Implante para conector óseo
	6.786.908	Implante de soporte de la fractura ósea con espaciadores que no son metal
	6.767.367	Implante de fusión vertebral que tiene proyecciones de enganche al hueso desplegables
	6.761.738	Implante moldeado reforzado formado de hueso cortical
25	6.755.832	Implante de la placa ósea
	6.730.129	Implante para la aplicación en el hueso, procedimiento para producir dicho implante y uso de dicho implante
	6.689.167	Procedimiento de utilización de un dispositivo de fusión vertebral, implante de articulación ósea e implante de fusión vertebral
30	6.689.136	Implante para fijar dos fragmentos de hueso entre sí
	6.666.890	Implante intervertebral semi-lumbar óseo que tiene un extremo de avance asimétrico y procedimiento para su instalación
	6.652.592	Implante óseo desmineralizado segmentalmente
	6.648.917	Implante de fusión ósea ajustable y procedimiento
35	6.607.557	Implante de injerto óseo artificial
	6.599.322	Procedimiento para producir micro rebajes socavados en una superficie, un implante quirúrgico realizado así y procedimiento para fijar un implante al hueso
	6.562.074	Implante de fusión ósea ajustable y procedimiento
	6.562.073	Implante de hueso vertebral
40	D473.944	Implante óseo
	6.540.770	Dispositivo de fijación reversible para asegurar un implante en el hueso

## ES 2 702 049 T3

	6.537.277	Implante para fijar una placa ósea
	6.506.051	Implante óseo con un elemento intermedio y ensamblaje de expansión
	6.478.825	Implante, procedimiento para su fabricación y uso del implante para el tratamiento de defectos óseos
5	6.458.136	Instrumento ortopédico para dimensionar sitios de implante y para presurizar cemento óseo y un procedimiento para su uso.
	6.447.545	Implante óseo de autoalineación
	6.436.146	Implante para tratar dolencias de una articulación o un hueso
10	6.371.986	Dispositivo de fusión espinal, implante de articulación del hueso e implante de fusión vertebral
	6.370.418	Dispositivo y procedimiento para medir la posición de un implante óseo
	6.364.880	Implante vertebral con tornillos de hueso
	6.350.283	Implante intervertebral semi-lumbar óseo que tiene un extremo de avance asimétrico y procedimiento para su instalación
15	6.350.126	Implante óseo
	6.287.343	Implante vertebral roscado con aberturas de increscencia de hueso
	6.270.346	Implante dental para el recrecimiento óseo
	6.248.109	Implante para interconectar dos fragmentos de hueso
	6.217.617	Implante óseo y procedimiento para asegurarlo
20	6.214.050	Implante expandible para estabilización intervertebral y adaptado para extrudir material osteogénico y un procedimiento de estabilización de huesos al mismo tiempo que se extrude el material osteogénico
	6.213.775	Procedimiento de sujeción de un implante a un hueso y un implante para ello
	6.206.923	Implante flexible utilizando hueso parcialmente desmineralizado
25	6.203.545	Implante para fijar fragmentos óseos tras la osteotomía
	6.149.689	Implante como reemplazamiento de hueso
	6.149.688	Implante de injerto óseo artificial
	6.149.686	Implante vertebral roscado con aberturas de increscencias de hueso
	6.126.662	Implante óseo
30	6.083.264	Material de implante para reemplazar o aumentar el tejido óseo vivo que implica espuma sintáctica termoplástica
	6.058.590	Aparato y procedimientos para embeber un material biocompatible en un implante óseo de polímero
	6.018.094	Implante y ensamblaje de inserto para hueso y usos del mismo
35	5.976.147	Instrumentación modular para preparación del hueso y reducción de pruebas de implante de implantes ortopédicos
	5.906.488	Dispositivo de retención desprendible que previene una rotación no deseada durante el apretado de una conexión roscada en un implante anclado al hueso
	5.899.939	Implante derivado del hueso para aplicaciones de soporte de carga
40	5.895.425	Implante de hueso
	5.890.902	Mecanismo de cierre de hueso de implante y sistema de ligamento periodontal artificial

	5.885.287	Implante óseo intervertebral de auto-impacto
	5.819.748	Implante para su uso en cirugía de huesos
	5.810.589	Combinación de estribo de implante dental que reduce la tensión del hueso crestal
	5.759.035	Implante dental de fusión ósea con anclaje híbrido
5	5.720.750	Dispositivo para la preparación de hueso tubular para la inserción de un eje de implante
	5.709.683	Implante de hueso intervertebral que tiene características de estabilización de unión conjunta para fusión del hueso
	5.709.547	Implante dental para el anclaje de hueso cortical
10	5.674.725	Materiales de implante que tienen una fosfatasa y un compuesto de organofosforo para la mineralización <i>in vivo</i> del hueso
	5.658.338	Manto de fijación del hueso modular protésico y sistema de implante
	D381.080	implante quirúrgico de base de cráneo metálico combinado y placa de fijación de pestaña de hueso
	5.639.402	Procedimiento para fabricar partes verdes de implante de hueso artificial
15	5.624.462	Implante óseo y procedimiento para asegurarlo
	D378.314	Implante vertebral óseo
	5.607.430	Implante de estabilización ósea que tiene una porción de placa ósea con medios de sujeción de cable integrados
20	5.571.185	Proceso para la producción de un implante óseo y un implante óseo producido con el mismo.
	5.456.723	Implante metálico anclaje al tejido óseo para reemplazar un hueso enfermo o roto
	5.441.538	Implante óseo y procedimiento para asegurarlo
	5.405.388	Implante de biopsia ósea
	5.397.358	Implante óseo
25	5.383.935	Implante protésico con corriente auto-generada para fijación temprana en el hueso esquelético
	5.364.268	Procedimiento para instalar una fijación de implante dental en hueso cortical
	5.312.256	Implante dental para penetración vertical, adaptado para diferentes grados de dureza del hueso

30 **V. Ensayos de identificación sistemática**

Se develan también procedimientos de identificación de nuevos anticuerpos útiles contra TGF- $\beta$  para su uso en la estimulación de la producción del hueso. Por ejemplo, un procedimiento comprende generalmente:

- (a) proporcionar un anticuerpo candidato;
  - (b) mezclar el modulador candidato con una célula o un animal experimental adecuado;
  - 35 (c) medir la actividad del osteoblasto u osteoclasto o crecimiento óseo, resistencia, masa o formación; y
  - (d) comparar las características medidas en la etapa (c) con las observadas en ausencia del candidato,
- en el que la diferencia entre las características medidas indica que dicho candidato es realmente un estimulador de la producción del hueso.

40 Los ensayos pueden llevarse a cabo en células aisladas o en organismos, incluyendo animales transgénicos. La formación de hueso puede identificarse por manchas de rojo de Alizarina o de von Kossa, FTIR o análisis de espectrometría de Raman o a través de fluorocromos ligados a compuestos que se unen al hueso.

## VI. Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar los modos de realización preferentes de la invención. Las personas expertas en la materia deberán apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan las técnicas que según ha descubierto el autor de la invención funcionan bien en la práctica de la invención y por tanto se puede considerar que constituyen modos de realización preferentes para su puesta en práctica. Sin embargo, las personas expertas en la materia, a la luz de la presente divulgación, pueden apreciar que es posible introducir muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y seguir obteniendo resultados iguales o similares.

### EJEMPLO 1 - MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

10 **Anticuerpos.** El anticuerpo 1D11 fue generado por Genzyme Corporation (Framingham). Anticuerpo de control (13C4) que corresponde a un complejo IgG idéntico que carece de cualquiera de las capacidades de unión de TGF- $\beta$ .

15 **Régimen de tratamiento.** Se trataron ratones C57B1/6 macho de 13 semanas de vida normales con 10 mg/kg/x 3 semanas de 1D11 o anticuerpo de control. Se administró cada uno de los reactivos por inyección intraperitoneal estéril a lo largo de un período de tiempo de 4 semanas (FIG. 1). Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo con arreglo a los protocolos IACUC aprobados en la Vanderbilt University Medical Center.

20 **Obtención de imágenes.** Se analizaron la tibia y el fémur por exploración por microCT (mCT40, Scanco) a un tamaño voxel isotrópico de 12  $\mu$ m (55 Kv). Una vez identificada la placa de crecimiento en cada grupo de escáner, se exploró la región metafisaria 200  $\mu$ m por debajo de esta área y se analizó en cuanto a las alteraciones de los parámetros del hueso trabecular (Umbral 280).

25 **Histología e histomorfometría.** Se recogieron los cuerpos de las vértebras lumbares (L3-5) y huesos largos después de sacrificar al animal y se fijaron durante hasta 48 horas en formalina al 10 %. Se procesaron las regiones descalcificadas y se embebieron en una resina a base de metacrilato de metilo y se cortaron a 5  $\mu$ m. Se desplastificaron los cortes y se tiñeron para detectar los iones de calcio unidos utilizando el procedimiento de Von Kossa con una contratinción de van Gieson o utilizando una técnica de tinción post-acoplamiento para fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Se descalcificaron los huesos largos durante 2 semanas en EDTA al 10 % y se procesaron en cera de parafina. Se cortaron las muestras a 5  $\mu$ m y se tiñeron con H&E/Orange G o en cuanto a la actividad TRAP. Se cuantificó el volumen del hueso, la distribución celular histomorfométricamente utilizando un software de cuantificación de osteomedición (Osteometrics).

30 **Expresión de gen.** Se evaluó la relación de expresión de gen RANKL/OPG en células de osteoblasto T23 tratadas con 1D11 o de control, con ARN aislado utilizando un kit de extracción RNEasy (Qiagen). Se adquirieron los cebadores Taqman validados y se analizaron las muestras utilizando un sistema de PCR en tiempo real 7300 (Applied Biosystems) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Se evaluó la expresión osteogénica utilizando técnicas de PCR en tiempo real normales.

35 **Expresión de proteína.** Se aisló suero normal de ratones tratados y sin tratar por exanguinación antes del sacrificio. Se evaluó el suero por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en cuanto a los niveles de RANKL soluble o proteína OPG utilizando un sistema de inmunoensayo de cuantiquina (R&D Systems) con concentrado y dilución de suero x 5 utilizado para RANKL u OPG, respectivamente.

40 **Ensayo de reabsorción de orina.** Se recogieron muestras de orina de todos los animales antes del sacrificio. Se cuantificó por ELISA el producto de descomposición de colágeno desoxipiridinoliina (DPD) utilizando el ensayo MicroVue-DPD assay (Quidel Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante y se normalizó a los niveles de creatinina de la orina (MicroVue-Creatinine, Quidel Corp.).

45 **Ensayo bioquímico.** Se analizaron la resistencia y el módulo de la región diafisaria del fémur bioquímicamente. Se colocaron horizontalmente los fémures recién extirpados sobre rodillos de soporte y se cargaron monotónicamente en flexión en tres puntos a una velocidad de 3 mm/min, utilizando el sistema de ensayo de materiales (Dynamight 8841; Instron). Se registró la curva de desplazamiento de la fuerza para proporcionar la máxima fuerza soportada por el hueso y la rigidez inicial. Aplicando ecuaciones de flexión y momento de inercia derivadas por microCT a partir de la teoría de haces (Schriefer y col., 2005), los autores de la invención convirtieron estas propiedades estructurales en módulo y resistencia de flexión del hueso entero.

50 **Microespectroscopia de Raman.** Se caracterizó la composición química del hueso por microespectroscopia de Raman (Renishaw). Se embebieron las tibias en PMMA y se cortaron en la metafisis por debajo del lugar de crecimiento para exponer una sección transversal del córtex. Se rectificó esta superficie con sucesivos papeles de lija de carburo de silicio y se pulieron con una suspensión espesa de alúmina de 1  $\mu$ m. Un objetivo de 50x enfocó el láser (fuente de diodo de láser de 785 nm) a una región de 3  $\mu$ m por debajo de la superficie del tejido y se recogió la luz inelástica con un espectrógrafo Renishaw (resolución espectral 1  $\text{cm}^{-1}$ ). Los espectros medidos consistieron en tres acumulaciones con un tiempo de integración de 10 s cada uno. Utilizando los scripts de Matlab habituales, se sustrajo la fluorescencia de fondo en los espectros mediante un algoritmo de ajuste polinómico modificado (Lieber y

col., 2003). Se recogieron los espectros de 10 emplazamientos trabeculares con la metafisis de la tibia (rectificada por debajo de la placa de crecimiento). Se calculó la relación entre mineral y colágeno como la intensidad máxima de fosfato v1 ( $962 \text{ cm}^{-1}$ ) por intensidad máxima de prolina ( $856 \text{ cm}^{-1}$ ) y se promedió por hueso.

- 5 **Nanoindentación.** Se cuantificó el módulo al nivel del tejido por nanoindentación. Se sondearon las regiones embebidas en resina de la diáfisis de la tibia utilizando un Nanoindenter XP (MTS XP). Se presionó la punta de un diamante de Berkovitch (ángulo de inclinación:  $142,3^\circ$ ; radio: 100 nm) en la superficie utilizando un esquema de carga trapezoidal del siguiente modo: 1) carga a una velocidad de esfuerzo de 0,5/s a una profundidad de  $1 \mu\text{m}$ , 2) retención en  $P_{\text{max}}$  durante 10 segundos, 3) descarga a  $350 \mu\text{N s}^{-1}$  a 90 % de  $P_{\text{max}}$  y 4) dejar el intentador sobre la superficie durante 60 segundos para establecer la deriva térmica. A partir de la curva de fuerza-desplazamiento resultante, se calculó el módulo elástico (E) del tejido en el punto de indentación ( $0,25 \mu\text{m}$  de resolución) siguiendo los procedimientos de Oliver and Pharr (2004). Esto implica un procedimiento de calibración inicial utilizando sílice fundida para establecer la relación entre la profundidad de la fisura y el área de contacto de la punta y para determinar la pendiente de la porción sin carga de la curva fuerza-desplazamiento. Se recogieron diez fisuras por hueso, representándose los datos como la media + SE.
- 10
- 15 **Análisis estadístico.** Se determinaron los valores estadísticamente significativos a través de las pruebas T de Students y Mann-Whitney, considerándose como significativo valores p inferiores a 0,05.

## EJEMPLO 2 - RESULTADOS

La inhibición de TGF- $\beta$  mediante el tratamiento con anticuerpo 1D11, representada en la FIG. 1, aumento significativamente el volumen de hueso largo en comparación con los controles (FIGS. 2A-B). El hueso trabecular en la metafisis de la tibia analizado por exploración de microCT presentó un espectacular aumento en BV/TV en general (Fig. 2C), la densidad mineral ósea (BMD) (FIG. 2D), el espesor trabecular (FIG. 2F) y la separación trabecular disminuyó (FIG. 2F) en los animales tratados con 1D11 en comparación con los ratones tratados con control. El análisis histomorfométrico de los cortes descalfificados de las vértebras lumbares corroboraron el análisis de microCT de los huesos largos. La inhibición de TGF- $\beta$  mediada por 1D11 condujo a un aumento del 54 % en BV/TV trabecular. Este aumento en el hueso fue acompañado de un mayor número trabecular, disminuyó la separación trabecular y aumentó el espesor trabecular (FIG. 3A-B).

20

25

Un análisis de la distribución celular ósea en los cortes vertebrales teñidos con TRAP presentó un número de osteoclastos y área superficial significativamente menores tras el tratamiento con 1D11 (FIGS. 4A-C). En cambio, se observó un elevado número de osteoblastos y área de osteoblastos que reviste la superficie ósea en los ratones que recibieron 1D11, en comparación con los controles (FIG. 4D). Por otra parte, las alteraciones en el número de células óseas, la masa ósea en general y la integridad esquelética pueden verse afectadas también por los cambios en la velocidad de remodelación del hueso. Para determinar las velocidades de renovación del hueso tras el tratamiento con 1D11, los autores de la invención evaluaron el producto de descomposición de colágeno desoxipiridinolina (DPD) en muestras de orina recogidas en el sacrificio. Como corroboración de los datos histomorfométricos, la relación DPD/creatinina indicó una disminución de la actividad restauradora tras el tratamiento con 1D11 (control =  $39,3 \pm 5,6$ ; 1D11 =  $12,0 \pm 6,2 \mu\text{g}$  proteína).

30

35

A lo largo de los últimos años se ha puesto de manifiesto que además de la cantidad de huesos globalmente presentes dentro del esqueleto, la calidad del hueso también es un elemento esencial para su consideración a la hora de analizar nuevas estrategias terapéuticas y su efecto sobre el esqueleto. Para abordarlo, los autores realizaron flexión en tres puntos sobre fémures extirpados para determinar el efecto del tratamiento con 1D11 sobre las propiedades biomecánicas del hueso. El bloqueo de la señalización de TGF- $\beta$  tuvo como resultado huesos considerablemente más fuertes con una mayor módulo y resistencia a la flexión del hueso en su conjunto (FIG. 5). Se examinó asimismo el efecto de 1D11 sobre el módulo esquelético al nivel del tejido utilizando nanoindentación. Estos hallazgos corroboran los datos biomédicos que muestran una potenciación del módulo a nivel tisular tras el tratamiento con 1D11 (Tabla 2). Por otra parte, la microspectroscopia de Raman permitió a los autores de la invención analizar y cuantificar el efecto del bloqueo de TGF- $\beta$  sobre los componentes de la composición del hueso. Estos estudios demostraron un aumento del 11 % en la relación entre el mineral y el colágeno del hueso trabecular en la metafisis de la tibia tras el tratamiento con 1D11. Sin embargo, la calidad de hidroxiapatita y la cristalinidad en general del componente inorgánico permaneció sin cambios (Tabla 2).

40

45

La integridad esquelética se mantiene cuando se equilibran la formación y actividad de los osteoblastos y osteoclastos. Un primer mecanismo que media la resorción ósea osteoclástica tiene lugar a través de osteoclastos de expresión RANKL/OPG. Dado que se ha demostrado anteriormente que TGF- $\beta$  altera la relación RANKL/OPG (Mohammad y col., 2009; Karst y col., 2004; Quinn y col., 2001; Thirunavukkarasu y col., 2001), los autores examinaron el efecto del tratamiento con 1D11 sobre la expresión de gen de RANKL/OPG en líneas celulares de osteoblasto *in vitro* y evaluaron los niveles de RANKL y proteína OPG *in vivo*, en muestras de suero de animales tratados con 1D11 o de control. En cultivo, el tratamiento con TGF- $\beta$  disminuyó la expresión de ARNm RANKL (rankl/gapdh;  $1,6 \pm 0,2$  frente a  $0,7 \pm 0,1$ ) y aumentó la expresión de gen OPG (opg/gapdh:  $1,7 \pm 0,1$  frente a  $2,4 \pm 0,2$ ). Este efecto fue bloqueado por la adición de 1D11 a cultivos de osteoblastos. Sin embargo, no fueron detectables cambios significativos en RANK individual (control =  $31,9 \pm 7,6$ ; 1D11 =  $17,0 \pm 1,8 \text{ pg/ml}$ ) o los niveles de proteína OPG (control =  $487,7 \pm 22,6$ ; 1D11 =  $451,5 \pm 20,4 \text{ pg/ml}$ ) en muestras de suero de ratones tratados o sin

50

55

60

5 tratar, si bien los menores niveles de RANKL condujeron a una disminución del 50 % en la relación RANKL/PG global. Por otra parte, se analizó *in vitro* el efecto directo de TGF- $\beta$  sobre la expresión de gen osteogénico. El tratamiento de células osteoblastos 2T3 con TGF- $\beta$  indujo una disminución del 49,3 % en la expresión de gen fosfatasa alcalina y un aumento de 331,8 % en la expresión de PTHrP, tal como se determina por PCR. Este aumento se evitó completamente con el tratamiento con 1D11 además de TGF- $\beta$ . No se observaron alteraciones en los niveles de expresión de runx2,  $\beta$ -catenina, colagente de tipo I u osteocalcina, observándose idénticos resultados en la línea celular de osteoblasto de MC3T3. En conjunto, estas investigaciones confirman el efecto beneficioso global en el esqueleto tras la neutralización de TGF- $\beta$  en el entorno de la médula ósea.

**Tabla 2 – Parámetros de composición de hueso tratado**

	Control	1D11
<i>Nanoindentación</i>		
Módulo a nivel tisular (GPa)	22,7 $\pm$ 0,5	24,3 $\pm$ 1,3*
<i>Microespectroscopia de Raman</i>		
Relación mineral/colágeno (%)	5,5 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,1*
Sustituciones de carbonato	0,185 $\pm$ 0,012	0,169 $\pm$ 0,009
Cristalinidad	0,078 $\pm$ 0,005	0,081 $\pm$ 0,002

10

### EJEMPLO 3 - EXPLICACIÓN

15 Este estudio investiga el uso de un anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$  como agente óseo anabólico y resalta el potencial de la inhibición de TGF- $\beta$  como mecanismo para aumentar la masa ósea. Los autores de la invención emplearon técnicas aceptadas convencionales junto con las tecnologías emergentes y analizaron a fondo el volumen, densidad, resistencia y composición del hueso. En conjunto, estos estudios demuestran que los fármacos dirigidos a bloquear la ruta de señalización de TGF- $\beta$  tienen la capacidad de regular positivamente el número de osteoblastos al mismo tiempo que disminuyen simultáneamente la cantidad de osteoclastos en la médula. Esto tiene como resultado un profundo aumento en el volumen y la calidad del hueso, similar a la que se observa en los estudios con roedores tratados con PTH (Dempster y col., 1993).

20 Existe una considerable necesidad de agentes anabólicos óseos más eficaces. En la actualidad, el enfoque terapéutico principal para la pérdida excesiva de hueso es a través del uso de anti-resorptivos, como bisfosfonatos. Si bien estos agentes son ciertamente capaces de reprimir una mayor resorción ósea, no tienen la capacidad de estimular nuevos ciclos de formación para reemplazar el hueso que se ha perdido. Los autores de la invención han demostrado que dirigirse a TGF- $\beta$  con un anticuerpo neutralizante tiene la capacidad de prevenir la destrucción ósea disminuyendo los osteoclastos, al mismo tiempo que aumenta simultáneamente los osteoblastos. El resultado directo es una mejora neta de la masa ósea dentro de las regiones esqueléticas axial y apendicular. Se demostró asimismo que los huesos largos eran considerablemente más fuertes con una potenciación de sus propiedades de composición de matriz favorable para la función esquelética normal.

30 La elevada pérdida ósea, como la que se observa en la osteoporosis, conduce frecuentemente a un aumento del riesgo de fracturas. Esta característica se deriva en última instancia de la pérdida en general de la resistencia y una menor calidad del hueso dentro del esqueleto. Se ha sugerido que este déficit de la calidad ósea no puede achacarse únicamente a una disminución del volumen del hueso solamente, lo cual indica un defecto intrínseco en la producción de nueva matriz ósea en estos individuos. El hueso normal comprende normalmente una relación equilibrada entre la matriz de colágeno orgánica y el componente mineral inorgánico. Si bien la excesiva falta de regulación de cada uno de los elementos tiene como resultado profundos efectos esqueléticos, la relación puede modificarse a lo largo de la vida para mejorar la resistencia global del hueso y la resistencia a la fractura. El tratamiento con 1D11 aumentó la relación entre mineral y colágeno de hueso trabecular sin perjudicar la pureza de la hidroxiapatita, tal como se evalúa según el nivel de sustituciones carbonato dentro del cristal, lo cual indica que la inhibición de TGF- $\beta$  dentro de este entorno favorece la producción de hueso de mejor calidad. Asimismo, la potenciación de las características de composición del hueso tratado con 1D11 se traducen bien a un aumento general de la resistencia del hueso en estos animales. Estos datos están corroborados por modelos de ratones modificados genéticamente en los que la interrupción de la señalización de TGF- $\beta$  aumenta la resistencia ósea (Balooch y col., 2005), si bien se desconoce si este sistema representaría o no un enfoque terapéutico viable y eficaz para mejorar la masa ósea. Los efectos beneficiosos y espectaculares registrados en el estudio de la invención proporcionan una sólida evidencia para el desarrollo de agentes farmacéuticos dirigidos específicamente a la inhibición de TGF- $\beta$  para potenciar la masa y resistencia óseas.

45 Las dosis intermitentes de hormona paratiroides (PTH) representan actualmente el único enfoque clínicamente

disponible para aumentar el volumen óseo. Sin embargo, el mecanismo a través del cual PTH induce dicho efecto sigue pendiente de aclaración. Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con PTH continuo estimula la resorción ósea osteoclastica y disminuye la masa ósea en general (Raisz, 2005). Al igual que PTH, la neutralización de TGF- $\beta$  con terapia de anticuerpo 1D11 mejoró en gran medida los parámetros esqueléticos y, al igual que PTH, el verdadero mecanismo a través del cual esto puede tener lugar sigue siendo desconocido. Pero, en contraste con los efectos de PTH, 1D11 regula negativamente osteoclastos, inhibiendo la degradación ósea y ofreciendo un enfoque dual para potenciar la masa ósea a través de un mayor número de osteoblastos y una menor resorción osteoclástica.

A pesar de la riqueza de referencias bibliográficas que describen los efectos de TGF- $\beta$  en las células óseas, aún sigue sin estar claro cómo media la inhibición de TGF- $\beta$  en los eventos esqueléticos *in vivo*. Los recientes estudios indican una falta de regularización en las moléculas osteoclastogénicas primarias (RANKL/OPG) o remodelación ósea mediada por efrina (Mohammad *y col.*, 2009).

Los autores de la invención han examinado niveles de proteína OPG y RANKL solubles en sueros de ratones tras el tratamiento con 1D11 o control y han señalado una tendencia hacia la disminución en la relación RANKL/OPG, provocada por una disminución de los niveles de RANKL. Este hallazgo puede ir asociado con la menor expresión de PTHrP observada en los osteoblastos tratados con 1D11, ya que se sabe que PTHrP estimula RANKL en este tipo de célula (Lee y Lorenzo, 1999; Itoh *y col.*, 2000). Si bien estas observaciones *in vivo* se corresponden con estudios actuales (Mohammad *y col.*, 2009) indican que el tratamiento con 1D11 podría aumentar el volumen del hueso al eliminar la regulación TGF- $\beta$  de RANKL o OPG en osteoblastos, lo cual en contraste con los estudios moleculares *in vitro*, indica que el tratamiento con TGF- $\beta$  conduce a una significativa reducción en RANKL y un aumento de la expresión de ARNm OPG, que podría ser bloqueada por 1D11. Estos hallazgos están en consonancia con los estudios publicados en los que se documenta la regularización de TGF- $\beta$  de RANKL/OPG *in vitro* (Quinn *y col.*, 2001; Thirunavukkarasu *y col.*, 2001) e indica sólidamente un papel diverso de TGF- $\beta$  en la fisiología normal, que no está bien recapitulada en sistemas de cultivo y probablemente dependa de las interacciones con otras moléculas reguladoras. Por tanto, es necesaria una interpretación cuidadosa de los resultados a la hora de analizar las diferencias de la función TGF- $\beta$  *in vitro* e *in vivo*.

Los osteoblastos se derivan de una población de células madre mesenquimales dentro de la médula ósea. Las células precursoras se activan para comprometerse con el linaje de osteoblastos mediante factores estimuladores como BMP-2 (Katagiri *y col.*, 1990; Takuwa *y col.*, 1991). El análisis molecular de la expresión de gen osteogénico, indicó que la actividad de osteoblastos puede alterarse mediante el tratamiento con 1D11 *in vitro*, evidenciado por mayores niveles de fosfatasa alcalina. Este hallazgo se correlaciona con los datos publicados (Filvaroff *y col.*, 1999; Alliston *y col.*, 2001; Kang *y col.*, 2005), pero no ilustra ningún efecto principal en la maduración de precursores para aumentar el número de osteoblastos, tal como lo demuestra los hallazgos de los autores de la invención *in vivo*. Esto indica que la inhibición de TGF- $\beta$  local en la médula ósea puede influir en la formación del hueso durante este período de tratamiento, pero el verdadero mecanismo que rige cualquier cambio en la osteoblastogénesis sigue siendo desconocido.

Además de los efectos directos sobre las células óseas, los autores de la invención no han sido capaces de excluir un efecto sistémico de TGF- $\beta$  en este sistema. Es posible que el control de TGF- $\beta$  de los procesos fisiológicos normales tengan un impacto negativo en la masa ósea y el bloqueo de estos efectos sea en última instancia beneficioso para la salud del esqueleto. Asimismo, es posible que el control de TGF- $\beta$  de la formación de células óseas o la actividad varíe temporalmente a medida que cambia la población celular de la médula. Esto se correspondería con los estudios *in vitro* en los que se describen efectos diferenciales en las células precursoras en comparación con la matriz madura que forma osteoblastos (Mundy and Bonewald, 1990). Los autores de la invención utilizaron ratones C57Bl/6 macho maduros para resaltar los efectos beneficiosos del bloqueo de TGF- $\beta$  en el esqueleto. Serán necesarios otros estudios posteriores en los que se utilicen modelos de pérdida ósea para evaluar si el tratamiento de 1D11 mejora el hueso en estas condiciones. A pesar de esto, el uso de ratones C57Bl/6, que según se notifica tienen la menor BMD de todas las cepas de ratones disponibles (Beamer *y col.*, 1996), indica que la inhibición de TGF- $\beta$  tiene probabilidad de mejorar las propiedades esqueléticas en modelos osteopénicos o con edad de masa ósea baja también.

Como corroboración de estos datos, se ha demostrado recientemente que las pequeñas moléculas dirigidas al bloqueo de la señalización de TGF- $\beta$  inhibiendo la actividad de quinasa de receptor TGF- $\beta$  aumentan la masa ósea (Mohammad *y col.*, 2009). Aunque estas moléculas demuestran una potenciación significativa en hueso trabecular, el bloqueo de TGF- $\beta$  mediado por 1D11 aumenta el volumen de hueso trabecular y mejora la resistencia del hueso cortical. Estos efectos del esqueleto superior pueden derivarse de la anulación completa de la señalización de TGF- $\beta$  a través de la unión ávida y neutralización de todas las isoformas TGF- $\beta$  extracelulares, en comparación con la inhibición de enzimas asociadas a receptor intracelular dirigidos actualmente a moléculas pequeñas. Estos hallazgos ilustran claramente el potencial de compuestos que pueden dirigirse específicamente a TGF- $\beta$  *in vivo* e indica un enfoque terapéutico para aumentar la masa ósea en condiciones en las que prevalece la destrucción del hueso excesiva, como por ejemplo, enfermedad ósea inducida por cáncer u osteoporosis.

En los siguientes artículos 1 a 34 se ilustran algunos aspectos de la divulgación:

1. Un procedimiento para aumentar la masa y/o el volumen óseo en un sujeto que comprende:

- (a) identificar a un paciente que necesita aumentar la masa y/o el volumen óseo; y
- (b) administrar a dicho sujeto un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF-β.

2. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho anticuerpo se une a las tres isoformas de TGF-β.

3. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho anticuerpo se designa como 1D11.

4. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho anticuerpo se administra a dicho sujeto sistémicamente.

5. El procedimiento del artículo 4, en el que dicho anticuerpo se administra intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente subcutáneamente o tópicamente.

6. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho anticuerpo se administra en un sitio diana del hueso.

7. El procedimiento del artículo 6, en el que dicho anticuerpo se inyecta en dicho sitio.

8. El procedimiento del artículo 6, en el que dicho anticuerpo está comprendido en un dispositivo de liberación prolongada implantado en dicho sitio.

9. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho sujeto es un ser humano.

10. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho sujeto es un animal no humano.

11. El procedimiento del artículo 10, en el que dicho animal no humano es un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono o una vaca.

12. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho sujeto tiene cáncer.

13. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho sujeto no tiene cáncer.

14. El procedimiento del artículo 1, comprende además al menos una segunda administración de dicho anticuerpo.

15. El procedimiento del artículo 14, en el que dicho sujeto recibe tres administraciones a la semana.

16. El procedimiento del artículo 14, en el que dicho sujeto recibe al menos 9 administraciones.

17. El procedimiento del artículo 1, que comprende además evaluar la masa ósea tras la administración de dicho anticuerpo.

18. El procedimiento del artículo 17, en el que la evaluación comprende la obtención de imágenes del hueso.

19. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho sujeto padece de osteoporosis, fractura del hueso, pérdida ósea debido a un traumatismo o enfermedad de Paget.

20. El procedimiento del artículo 1, en el que dicho sujeto padece de pérdida ósea debido a metástasis de cáncer.

21. Un procedimiento para aumentar el crecimiento óseo en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF-β.

22. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho anticuerpo se une a las tres isoformas de TGF-β.

23. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho anticuerpo se designa como 1D11.

24. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho anticuerpo se administra a dicho sujeto sistémicamente.

25. El procedimiento del artículo 24, en el que dicho anticuerpo se administra intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente o tópicamente.

26. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho anticuerpo se administra en un sitio diana del hueso.

27. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho sujeto tiene cáncer.

28. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho sujeto no tiene cáncer.

29. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho sujeto es un ser humano.

30. El procedimiento del artículo 21, en el que dicho sujeto es un animal no humano.

31. Un procedimiento para aumentar número de osteoblastos en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF-β.

32. Un procedimiento para disminuir el número de osteoclastos en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF-β.

33. Un procedimiento para aumentar la resistencia ósea en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF-β.

34. Un procedimiento para disminuir la señalización de TGF-β en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto un anticuerpo que se une inmunológicamente al TGF-β.

## VII. Referencias

Patente estadounidense 4.196.265

Patente estadounidense 4.722.948

Patente estadounidense 4.843.112

Patente estadounidense 4.863.732

Patente estadounidense 4.975.526

Patente estadounidense 5.571.714

Patente estadounidense 5.772.998

Patente estadounidense 5.783.185

Patente estadounidense 5.085.861

Patente estadounidense 5.162.114

Patente estadounidense 5.399.363

Patente estadounidense 5.466.468

Patente estadounidense 5.531.791



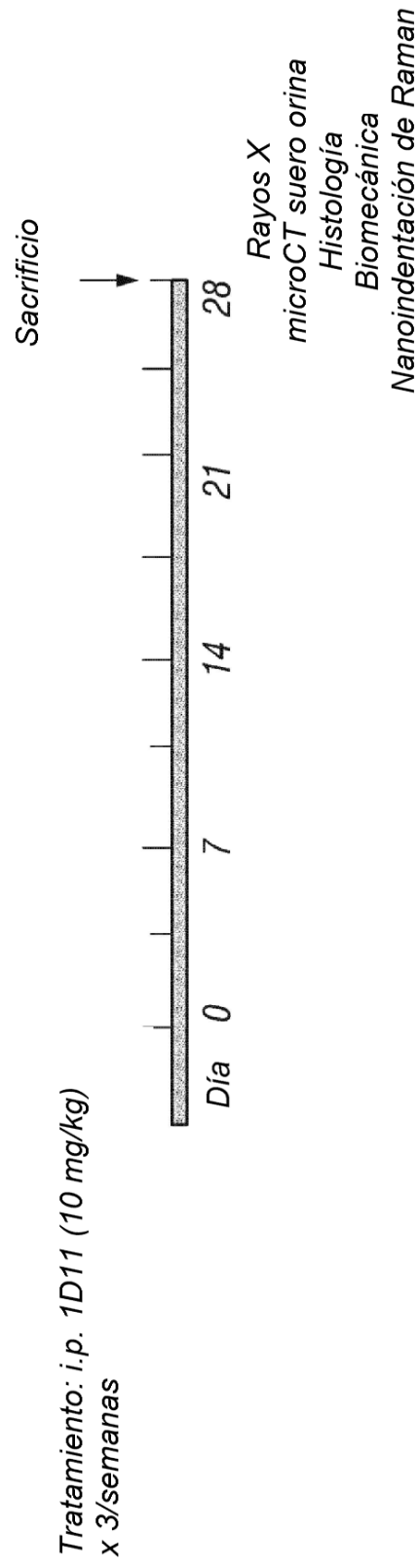
- Patente estadounidense 5.543.158  
 Patente estadounidense 5.580.579  
 Patente estadounidense 5.629.001  
 Patente estadounidense 5.641.515  
 5 Patente estadounidense 5.741.796  
 Patente estadounidense 5.792.451  
 Patente estadounidense 5.840.290  
 Patente estadounidense 5.972.703  
 Patente estadounidense 6.074.674  
 10 Patente estadounidense 6.270.750  
 Patente estadounidense 6.281.195  
 Patente estadounidense 6.288.043  
 Patente estadounidense 6.485.754  
 Patente estadounidense 6.537.514  
 15 Patente estadounidense 6.613.308  
 Patente estadounidense 6.662.805  
 Patente estadounidense 6.936.270  
 Patente estadounidense 7.008.433  
 Alliston y col., EMJO. J., 20(9):2254-2272, 2001.  
 20 Ashton y col., Bone, 6:313-319,1985.  
 Aubin, Biochem. Cell Biology, 76:899-910,1998.  
 Balooch y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 102(52):18813-18818, 2005.  
 Beamer y col., Bone, 18(5):397-403, 1996.  
 Beidler y col., J. Immunol., 141(11):4053-4060, 1988.  
 25 Bleiberg, Connect Tissue Res., 14:121-127,1985.  
 Campbell y col., Am. Rev. Respir. Dis., 130(3):417-423, 1984.  
 Cavo y col., New England Journal of Medicine 354:1076-1078, 2006.  
 Dempster y col., Endocr. Rev., 14(6):690-709, 1993.  
 Solicitud EP 125,023  
 30 Solicitud EP 171,496  
 Solicitud EP 173,494  
 Solicitud EP 184,187  
 Filvaroff y col., Development, 126(19):4267-4279, 1999.  
 Friedenstein y col., Exp. Hematol., 10:217-227,1982.  
 35 Friedenstein y col., Transplantation, 6:230-247,1968.  
 Geffer y col., Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.  
 Goding, In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª ed., Academic Press, Orlando, Fl, pp 60-61, 71-74,  
 1986.  
 Gronthos y col., Blood, 84:4164-4173,1994.  
 40 Gronthos y col., J. Bone Min. Res., 14:47-56,1999.  
 Harlow and Lane, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.  
 Hwang y col., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 15(3):243-284, 1998.  
 Itoh y col., J. Bone Miner res., 15(9):1766-1775, 2000.  
 Jaiswal y col., J. Biol. Chem., 275:9645-9652, 2000.  
 45 Jones y col., Nature, 321:522-525, 1986.  
 Kadiyala y col., Cell Transplantation, 6:125-134,1997.  
 Kale y col., Nat. Biotech., 18:954-958, 2000.  
 Kang y col., EMBO. J., 24(14):2543-2555, 2005.  
 Karst y col., J. Cell Physiol., 200:99-106, 2004.  
 50 Katagiri y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 172(1):295-299, 1990.  
 Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976.  
 Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975.  
 Lee and Lorenzo, Endocrinology, 140(8):3552-3561, 1999.  
 Lieber y col., Appl. Spectrosc. 57:1363-67, 2003.  
 55 Long, J. Clin. Invest., 95:881-887, 1995.  
 Mathiowitz y col., Nature, 386(6623):410-414, 1997.  
 Mohammad y col., PLoS ONE, 4:e5275, 2009.  
 Morrison, Science, 229(4719):1202-1207, 1985.  
 Mundy and Bonewald, Ann. NY Acad. Sci., 593:91-97, 1990.  
 60 Oliver & Pharr, J. Mater. Res., 19:3-20, 2004.  
 Solicitud PCT PCT/US86/02269  
 Solicitud PCT WO 86/01533  
 Petite y col., Nat. Biotech., 18:959-963,2000.  
 Phinney y col., J. Cellular Biochem., 75:424-436,1999.  
 65 Pittenger y col., Science, 284:143-147,1999.  
 Quinn y col., J. Bone Miner. Res., 16:1787-94, 2001.

- Raisz, J. Clin. Invest., 115(12):3318-3325, 2005.  
Reddi and Huggins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:1601-1605, 1972.  
Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., páginas 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- 5 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, pp. 1289-1329, 1990.  
Schriefer y col., J. Biomech., 38:467-75, 2006.  
Shaw y col., J. Natl. Cancer Inst., 80(19):1553-1559, 1988.  
Sun y col., J. Steroid Biochem., 26(1):83-92, 1987.  
Takuwa y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 174(1):96-101, 1991.
- 10 Terpos y col., Annals of Oncology 16:1223-1231, 2005.  
Thirunavukkarasu y col., J. Biol. Chem., 276:36241-50, 2001.  
Verhoeyen y col., Science, 239(4847):1534-1536, 1988.  
Wood y col., J. Clin. Lab. Immunol., 17(4):167-171, 1985.  
Zohar y col., Blood, 90:3471-3481, 1997.

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo que se une inmunológicamente a TGF- $\beta$  para su uso en un procedimiento para aumentar la masa y/o el volumen óseo en un sujeto o para su uso en un procedimiento para aumentar el crecimiento óseo en un sujeto, en el que dicho anticuerpo es 1D11 (Designación de depósito ATCC No. HB 9849) o una versión humanizada de 1D11 o una versión obtenida por ingeniería genética que contiene las CDR de 1D11 en un marco heterólogo en el que dicho sujeto padece de osteoporosis, fractura de hueso, pérdida ósea debido a traumatismo o enfermedad de Paget, y en el que dicho sujeto no tiene cáncer.
- 10 2. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los procedimientos para aumentar la masa y/o el volumen óseo y el crecimiento óseo comprenden la administración de dicho anticuerpo a dicho sujeto sistémicamente, en particular intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente o tópicamente.
- 15 3. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los procedimientos para aumentar la masa y/o el volumen óseo y el crecimiento óseo comprenden la administración de dicho anticuerpo en el sitio diana del hueso, en particular en el que el procedimiento para aumentar la masa y/o el volumen óseo comprende inyectar dicho anticuerpo en dicho sitio o a través de un dispositivo de liberación prolongada implantado en dicho sitio.
4. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un ser humano o un animal no humano, en particular en el que el procedimiento es un procedimiento para aumentar la masa ósea y dicho animal no humano es un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, un caballo, un mono o una vaca.
- 20 5. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo 1D11 es una versión humanizada de 1D11.
6. El anticuerpo para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5, en el que el anticuerpo 1D11 es una versión obtenida por ingeniería genética que contiene las CDR de 1D11 en un marco heterólogo.
7. El anticuerpo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es 1D11.



**FIG. 1**

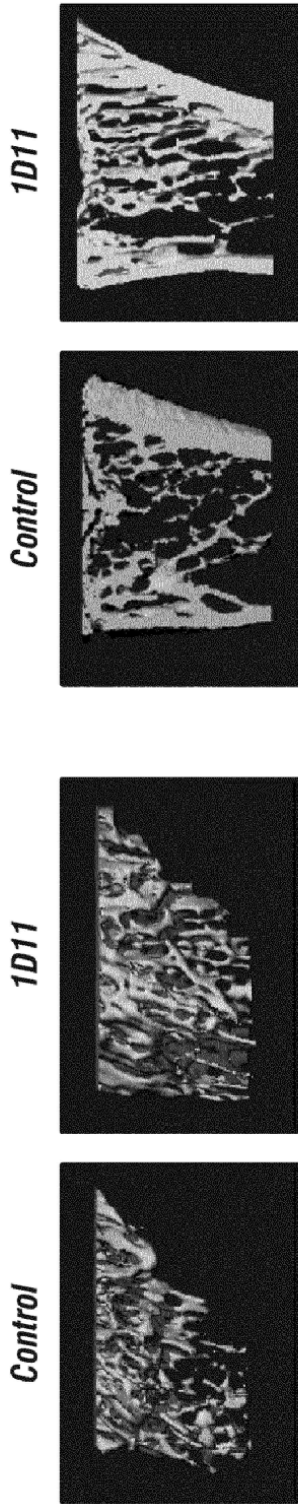


FIG. 2B

FIG. 2A

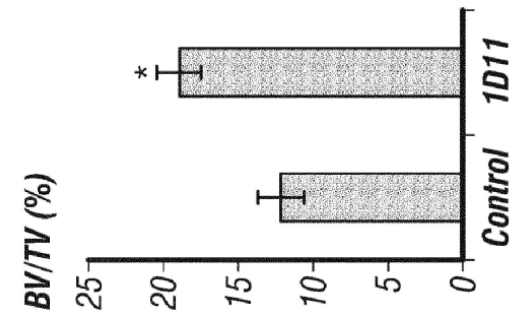


FIG. 2C

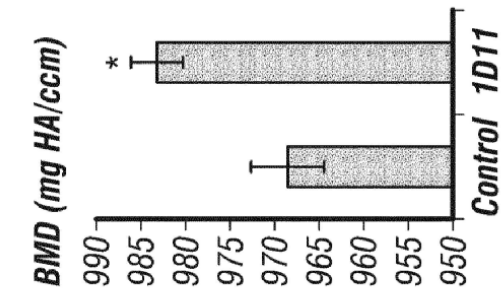


FIG. 2D

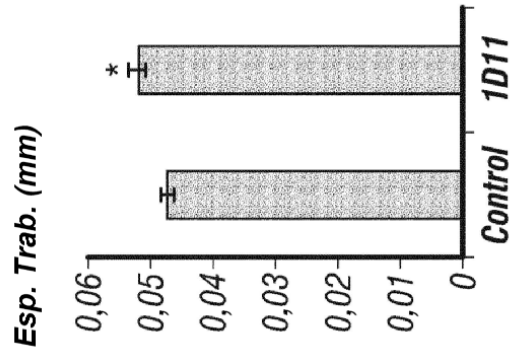


FIG. 2E

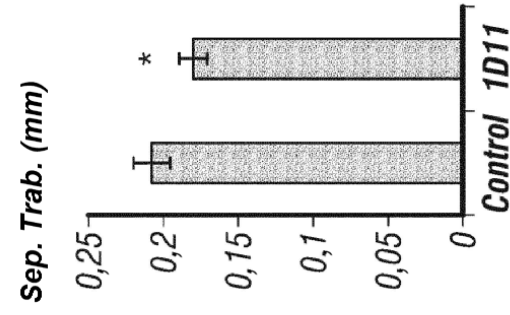
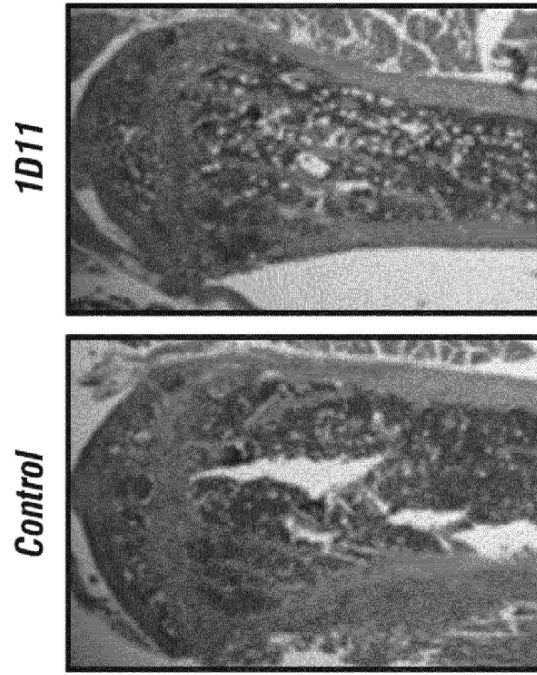
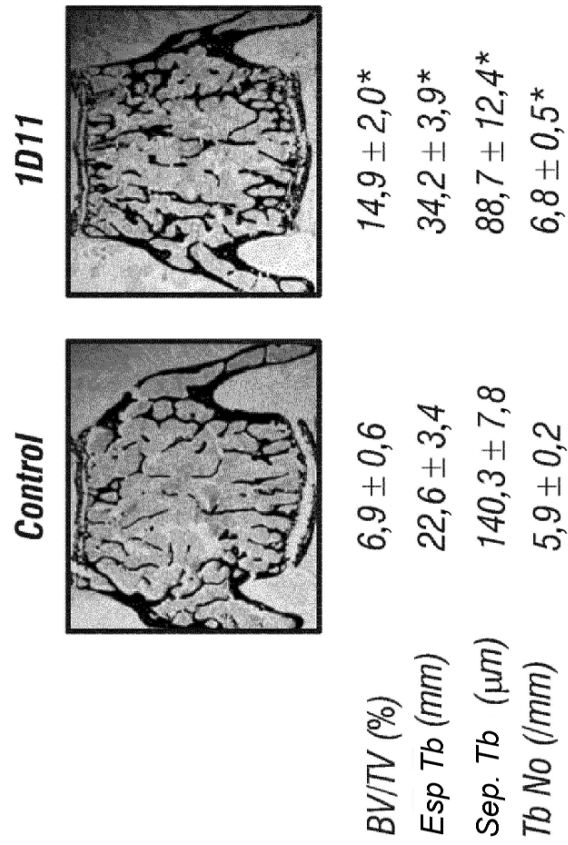


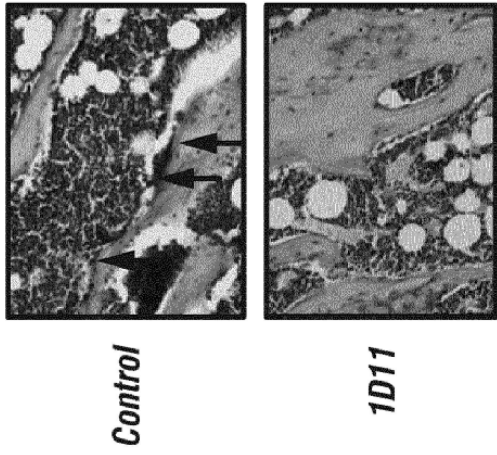
FIG. 2F



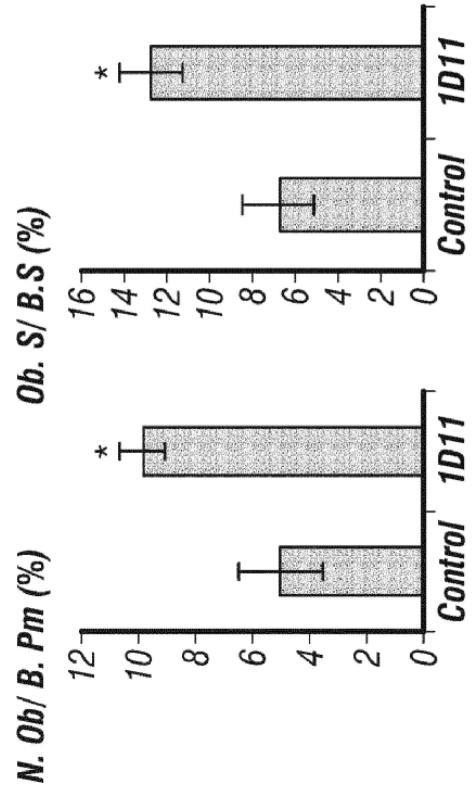
**FIG. 3B**



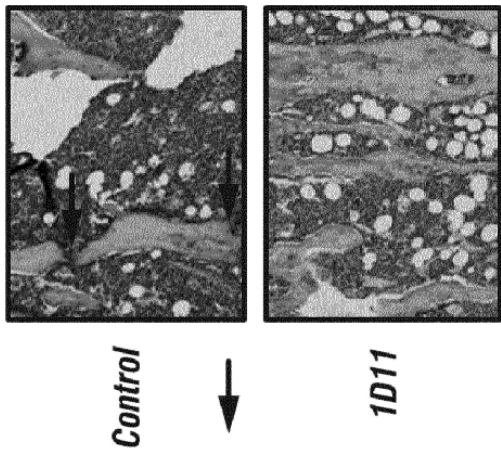
**FIG. 3A**



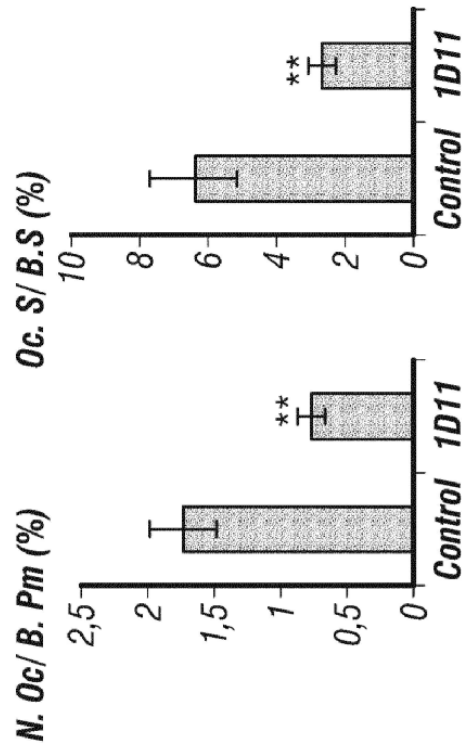
**FIG. 4B**



**FIG. 4D**



**FIG. 4A**



**FIG. 4C**

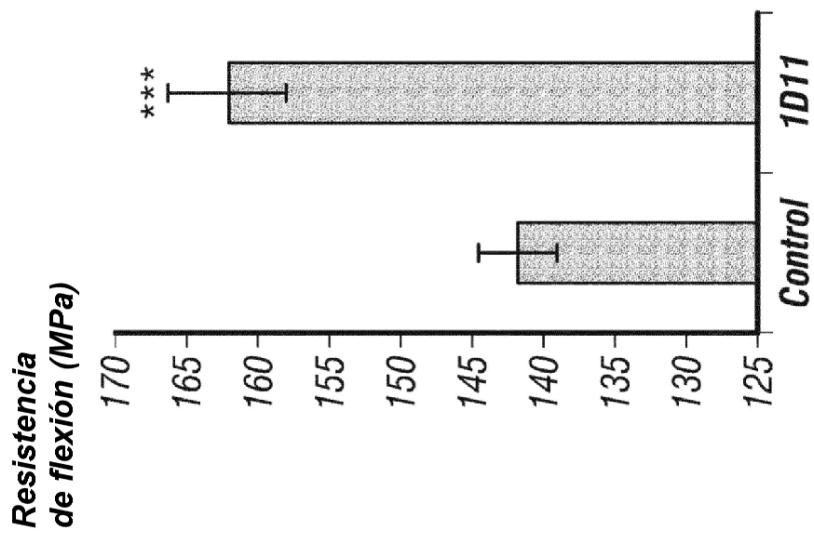


FIG. 5A

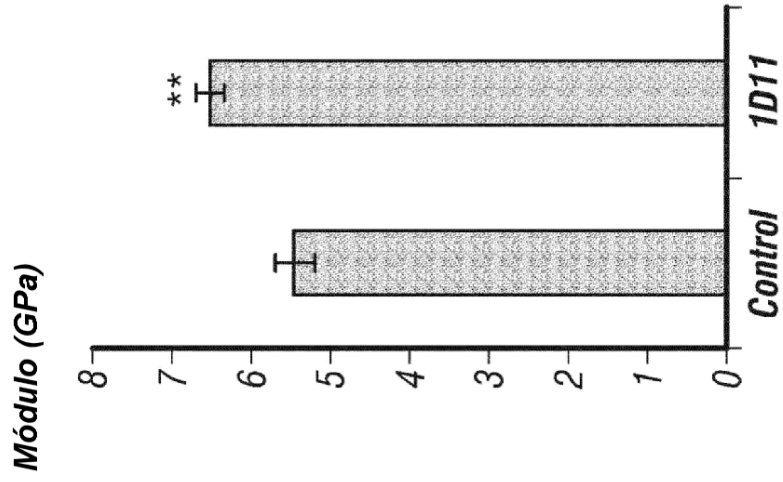


FIG. 5B

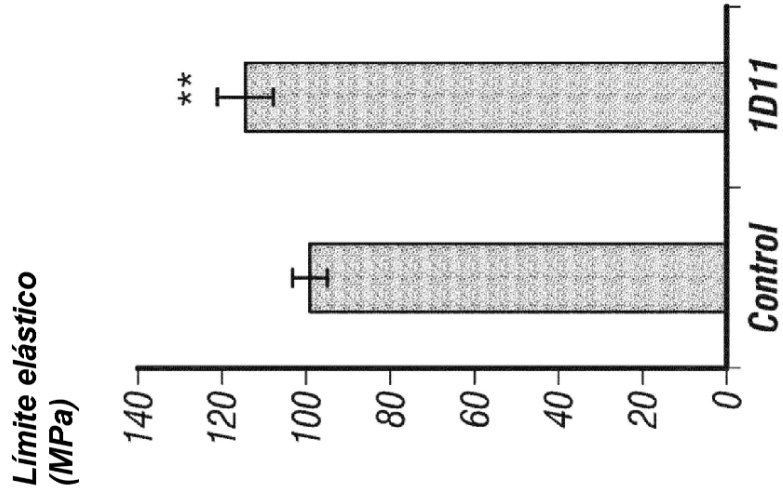


FIG. 5C