

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 885**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2013 PCT/CA2013/000646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14012165**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2013 E 13819634 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2875051**

54 Título: **Anticuerpos anti-Siglec-15**

30 Prioridad:

19.07.2012 US 201261673442 P

12.03.2013 US 201361777049 P

10.04.2013 US 201361810415 P

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

03.09.2019

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**STUIBLE, MATTHEW;
TREMBLAY, GILLES, BERNARD;
SULEA, TRAIAN;
MORAITIS, ANNA, N. y
FILION, MARIO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 723 885 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-Siglec-15

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a Siglec-15. La presente invención se refiere particularmente a anticuerpos anti-Siglec-15 adaptados para la administración a anticuerpos humanos y/o anti-Siglec-15 que comprenden aminoácidos de una región constante de IgG1 humana. La presente invención también se refiere a anticuerpos anti-Siglec-15 para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades o afecciones.

10 Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar, por ejemplo, para inhibir la actividad o función de Siglec-15 o para administrar agentes terapéuticos a células que expresan la proteína.

Antecedentes de la invención

15 El hueso es un tejido conectivo dinámico compuesto por poblaciones de células funcionalmente distintas requeridas para respaldar la integridad estructural, mecánica y bioquímica del hueso y la homeostasis mineral del cuerpo humano. Los principales tipos de células involucrados incluyen, osteoblastos responsables de la formación ósea y el mantenimiento de la masa ósea, y osteoclastos responsables de la resorción ósea. Los osteoblastos y los osteoclastos funcionan en un proceso dinámico denominado remodelación ósea. El desarrollo y la proliferación de estas células a partir de sus progenitores se rigen por redes de factores de crecimiento y citoquinas producidas en el microentorno óseo, así como por hormonas sistémicas. La remodelación ósea es continua durante el transcurso de
20 toda la vida del individuo y es necesaria para el mantenimiento de tejido óseo sano y homeostasis mineral. El proceso permanece en gran parte en equilibrio y se rige por una compleja interacción de hormonas sistémicas, péptidos y proteínas de la vía de señalización posterior, factores de transcripción locales, citoquinas, factores de crecimiento y genes de remodelación de la matriz.

25 Una interferencia o desequilibrio que surge en el proceso de remodelación ósea puede producir una enfermedad esquelética, con los trastornos esqueléticos más comunes caracterizados por una disminución neta en la masa ósea. Una causa principal de esta reducción en la masa ósea es un aumento en el número y/o actividad de los osteoclastos. La enfermedad más común, y quizás la más conocida, es la osteoporosis que se presenta particularmente en las mujeres después del inicio de la menopausia. De hecho, la osteoporosis es la causa
30 subyacente más importante de las fracturas esqueléticas en mujeres de mediana edad avanzada y en mujeres ancianas. Si bien la deficiencia de estrógeno ha sido fuertemente implicada como un factor en la osteoporosis posmenopáusica, hay evidencia de larga data de que la remodelación es un proceso controlado localmente que ocurre en paquetes discretos a lo largo de la cadena principal como lo describió Frost hace más de cuarenta años (Frost HM, 1964).

35 Dado que la remodelación ósea se realiza en paquetes discretos, las hormonas y enzimas producidas localmente pueden ser más importantes que las hormonas sistémicas para el inicio de la resorción ósea y el proceso de remodelación normal. Dicho control local está mediado por los osteoblastos y los osteoclastos en el microambiente en el que operan. Por ejemplo, los osteoclastos se adhieren a la matriz ósea y forman un compartimento separado
40 entre ellos y la superficie ósea delimitada por una zona de sellado formada por un anillo de actina que rodea el borde rizado. Múltiples pequeñas vesículas transportan las enzimas hacia la matriz ósea e interiorizan la matriz ósea parcialmente digerida. El microentorno dentro de la zona de sellado es rico con la presencia de enzimas lisosomales y es altamente ácido en comparación con el pH fisiológico normal del cuerpo. La membrana del borde rizado también expresa RANK, el receptor para RANKL y el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), ambos responsables de la diferenciación de osteoclastos, así como el receptor de calcitonina capaz de inactivar rápidamente el osteoclasto (Baron, R., 2003).

45 En un patrón complejo de inhibición y estimulación, la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento 1 tipo insulina, los esteroides sexuales, la hormona tiroidea, las hormonas calciotróficas como la PTH y la prostaglandina E2, varias citoquinas, como la interleuquina 1 beta, la interleuquina 6, y el factor alfa de necrosis tumoral, y la 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol) actúan de manera coordinada en el proceso de remodelación ósea (Jilka et al., 1992; Poli et al., 1994; Srivastava et al., 1998; de Vemejoul, 1996).

55 Por lo tanto, es lógico pensar que los entornos locales únicos creados por estas células especializadas se deben a la expresión de secuencias genéticas únicas que no se expresan en otros tejidos y/o variantes de empalme de polinucleótidos y polipéptidos expresados en otros tejidos. El aislamiento y la identificación de polinucleótidos, polipéptidos y sus variantes y derivados específicos de la actividad de los osteoclastos puede permitir una comprensión más clara del proceso de remodelación y ofrecer objetivos terapéuticos específicos de tejidos para el
60 tratamiento de estados patológicos relacionados con la remodelación ósea.

Muchas enfermedades relacionadas con la remodelación ósea son poco conocidas, generalmente no tratables o tratables solo en un grado limitado. Por ejemplo, la osteoartritis es difícil de tratar ya que no hay cura y el tratamiento

se enfoca en aliviar el dolor y prevenir que la articulación afectada se deforme. Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) generalmente se usan para aliviar el dolor.

Otro ejemplo es la osteoporosis, en la que los únicos medicamentos actuales aprobados por la FDA para su uso en los Estados Unidos son los agentes antirresortivos que evitan la ruptura ósea. La terapia de reemplazo de estrógeno es un ejemplo de un agente antirresortivo. Otros incluyen alendronato (Fosamax, un bifosfonato antirresortivo), risedronato (Actonel, un bisfosfonato antirresortivo), Raloxifeno (Evista, modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM)), calcitonina (Calcimar, una hormona) y hormona paratiroidea/teriparatida (Forteo, una versión sintética de la hormona humana, la hormona paratiroidea, que ayuda a regular el metabolismo del calcio).

Los bifosfonatos, como el alendronato y el risedronato, se unen permanentemente a la superficie del hueso e interfieren con la actividad de los osteoclastos. Esto permite que los osteoblastos superen la tasa de resorción. Los efectos secundarios más comunes son náuseas, dolor abdominal y evacuaciones intestinales sueltas. Sin embargo, se informa que el alendronato también causa irritación e inflamación del esófago, y en algunos casos, úlceras del esófago. El risedronato es químicamente diferente del alendronato y tiene menos probabilidades de causar irritación del esófago. Sin embargo, ciertos alimentos, calcio, suplementos de hierro, vitaminas y minerales, o antiácidos que contienen calcio, magnesio o aluminio pueden reducir la absorción de risedronato, lo que resulta en una pérdida de efectividad.

El efecto secundario más común del Raloxifeno y otros SERMS (como el Tamoxifeno) son los sofocos. Sin embargo, se ha demostrado que el Raloxifeno y otras terapias de reemplazo hormonal aumentan el riesgo de coágulos sanguíneos, incluida la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

La calcitonina no es tan eficaz para aumentar la densidad ósea y fortalecer el hueso como el estrógeno y los otros agentes antirresortivos. Los efectos secundarios comunes de la calcitonina inyectada o del aerosol nasal son náuseas y sofocos. Los pacientes pueden desarrollar irritaciones nasales, secreción nasal o hemorragias nasales. La calcitonina inyectable puede causar enrojecimiento local de la piel en el lugar de la inyección, erupción cutánea y enrojecimiento.

Una situación que demuestra el vínculo entre varios trastornos o estados de enfermedad que implican la remodelación ósea es la del uso de etidronato (Didronel) aprobado primero por la FDA para tratar la enfermedad de Paget. La enfermedad de Paget es una enfermedad ósea caracterizada por una remodelación desordenada y acelerada del hueso, que conduce a debilidad y dolor de los huesos. Didronel se ha usado "en forma alternativa" y en algunos estudios se ha demostrado que aumenta la densidad ósea en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis establecida. También se ha encontrado eficaz en la prevención de la pérdida ósea en pacientes que requieren medicamentos esteroideos a largo plazo (como Prednisona o Cortisona). Sin embargo, las dosis altas o el uso continuo de Didronel pueden causar otra enfermedad ósea llamada osteomalacia. Al igual que la osteoporosis, la osteomalacia puede conducir a huesos débiles con mayor riesgo de fracturas. Debido a las preocupaciones de la osteomalacia y la falta de estudios suficientes sobre la reducción de la tasa de fracturas óseas, la FDA de los Estados Unidos no ha aprobado el tratamiento con Didronel para la osteoporosis.

La terapia de osteoporosis se ha centrado principalmente en los fármacos antirresortivos que reducen la tasa de pérdida ósea, pero las terapias emergentes son prometedoras para aumentar la densidad mineral ósea en lugar de simplemente mantenerla o ralentizar su deterioro. La etapa inicial de la osteoporosis consiste principalmente en candidatos de fármacos en nuevas clases terapéuticas, en particular inhibidores de la catepsina K, osteoprotegerina y calcilíticos, así como nuevos bisfosfonatos. Algunos de estos son ejemplos en los que se están desarrollando nuevos fármacos que explotan programas de genómica basados en una comprensión más profunda de la biología ósea y que tienen el potencial de cambiar la cara del tratamiento de los trastornos óseos a largo plazo.

La presente invención se refiere particularmente a anticuerpos anti-Siglec-15 adaptados para la administración a seres humanos. La presente invención también se refiere particularmente a anticuerpos anti-Siglec-15 que comprenden aminoácidos de una región constante de IgG1 humana (por ejemplo, incluyendo anticuerpos humanizados, quiméricos o no humanizados). En algunos casos, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a un epítipo que es único para una proteína Siglec-15 humana y que no se encuentra en una proteína Siglec-15 correspondiente de otras especies (por ejemplo, no se encuentra en los ortólogos de Siglec-15 u ortólogos putativos). En otros casos, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a un epítipo que es común a una proteína Siglec-15 humana y una proteína Siglec-15 de ratón. Aún en otros casos, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a un epítipo que es común a Siglec-15 humano y otros ortólogos u ortólogos putativos (véase, por ejemplo, Angata et al., 2007).

La presente invención describe anticuerpos específicos para Siglec-15 para su uso en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento (incluida la prevención) de cáncer o pérdida ósea (por ejemplo, pérdida ósea severa o excesiva asociada con enfermedad relacionada con el hueso o asociada con un incremento en la diferenciación o actividad de los osteoclastos). En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-Siglec-15 para su uso en la inhibición de la diferenciación de osteoclastos y/o para inhibir la resorción ósea. La presente invención también se refiere al

uso de estos anticuerpos para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de varios otros tipos de enfermedades en las que aumenta la actividad de los osteoclastos.

Las lectinas de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico (Siglec) son miembros de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig) que tienen la capacidad de interactuar con los ácidos siálicos (McMillan y Crocker, 2008; Crocker et al., 2007). Hay varios miembros de la familia Siglec que comparten características estructurales específicas, en particular, que muestran un dominio de la Ig del conjunto V en el extremo terminal amino que se une al ácido siálico y un número variable de dominios de la Ig del conjunto C2. Estos receptores de membrana generalmente se expresan de maneras muy específicas y muchos de los miembros de la familia se expresan en células hematopoyéticas (McMillan y Crocker, 2008). Se cree que estas proteínas promueven las interacciones célula-célula, median la señalización y regulan las funciones inmunitarias a través del reconocimiento de los glucanos (Crocker et al., 2007). Los ácidos siálicos son azúcares de nueve carbonos que generalmente se encuentran en los extremos de los glicoconjugados complejos en la superficie de las células. Se pueden unir a una amplia variedad de proteínas y lípidos (McMillan y Crocker, 2008).

Siglec-15 es uno de los miembros de la familia Siglec descritos más recientemente que tienen una alta homología con Siglec-14 (Angata et al., 2007). Estos autores informaron que se une preferentemente a la estructura sialil-Tn y que interactúa con DAP12 y DAP10. La importancia funcional de estas interacciones no se conoce, pero se propuso que Siglec-15 probablemente alberga una función activadora (Angata et al., 2007). A pesar de estos conocimientos preliminares sobre un posible papel en los mamíferos de Siglec-15, se aportaron importantes avances en la comprensión de la función biológica de la proteína cuando la secuencia se identificó como parte de un cribado para descubrir nuevos reguladores de la diferenciación de osteoclastos (Sooknanan et al., 2007). En esta solicitud de patente, se reveló que la atenuación del transcrito de Siglec-15 por el ARN interferente en un modelo de ratón de osteoclastogénesis resultó en una reducción significativa de la diferenciación de los precursores en respuesta al tratamiento con RANKL. Se revelaron resultados similares en osteoclastos humanos. Además, los estudios presentados en esta divulgación también mostraron que la localización de Siglec-15 en la membrana celular era necesaria para su función en la diferenciación de osteoclastos. Además, una publicación reciente mostró que la presencia de ácido siálico en el extremo de los glicoconjugados de la superficie era necesaria para la diferenciación adecuada de los osteoclastos y probablemente era importante para la fusión de las células precursoras de los osteoclastos (Takahata et al., 2007). Esta última observación crea un enlace funcional directo entre la unión del ácido siálico y la expresión de Siglec-15 en la diferenciación de los osteoclastos y sugiere firmemente que Siglec-15 juega un papel en el programa de diferenciación temprana de los precursores de osteoclastos.

Por lo tanto, el perfil de expresión de Siglec-15, su fuerte inducibilidad durante la diferenciación de los osteoclastos, su localización en la superficie de la membrana y sus características estructurales contribuyen a la viabilidad de direccionar esta proteína a la superficie celular con anticuerpos monoclonales. El único otro ejemplo de terapia basada en anticuerpos monoclonales que se dirige a los osteoclastos es el denosumab, un anticuerpo monoclonal humano que es específico para RANKL (Ellis et al., 2008). La presente invención se refiere a anticuerpos anti-Siglec-15 para su uso como bloqueadores de la diferenciación de osteoclastos y/o la resorción ósea, en la detección o el tratamiento de la pérdida ósea, especialmente en el contexto de enfermedades relacionadas con los huesos o en el contexto de una mayor diferenciación o actividad de osteoclastos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos como se define en las reivindicaciones.

Las características preferidas y opcionales son las establecidas en las reivindicaciones dependientes.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de la pérdida ósea o la resorción ósea.

Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno también pueden ser particularmente útiles para la detección de osteoclastos diferenciados u osteoclastos que experimentan diferenciación. Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno pueden ser útiles para la detección y el diagnóstico de pérdida ósea. Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser útiles para tratar la pérdida ósea.

Los anticuerpos también pueden ser particularmente útiles para la detección o diagnóstico de células cancerosas que expresan Siglec-15 y particularmente cánceres que tienen una alta expresión de Siglec-15. Los anticuerpos también pueden ser particularmente útiles para la detección de cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de colon. Los anticuerpos también pueden ser útiles para tratar el cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de colon.

Los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a los aminoácidos 20 a 259 de Siglec-15 (SEQ ID NO: 2) o a una región correspondiente de una variante de Siglec-15 (por ejemplo, una variante que tiene al menos el 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12, que incluye, por ejemplo, la SEQ ID NO: 4). Más particularmente, los

anticuerpos de la presente invención pueden unirse a los aminoácidos 49 a 165 de Siglec-15 (SEQ ID NO: 2) o a una región correspondiente de una variante de Siglec-15 (por ejemplo, una variante que tiene al menos el 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12 incluyendo, por ejemplo, la SEQ ID NO: 4). Los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos que pueden unirse a un epítipo único para Siglec-15 humano que incluye, por ejemplo, un epítipo que comprende la arginina ubicada en la posición 99 (R99) de la SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo puede ser capaz de inhibir una actividad de diferenciación de osteoclastos del polipéptido y/o la resorción ósea.

En el presente documento debe entenderse que los anticuerpos que se unen preferiblemente a Siglec-15 humano sobre Siglec-15 de ratón pueden ser más eficaces para inhibir la diferenciación o actividad de los osteoclastos humanos que los osteoclastos de ratón. Un anticuerpo que se une a un epítipo encontrado en Siglec-15 humano y no en Siglec-15 de ratón, puede inhibir la diferenciación o actividad de los osteoclastos humanos y no la de los osteoclastos de ratón. La proteína Siglec-15 de los monos *cynomolgus* es muy similar a la de los aminoácidos de Siglec-15 humano. La potencia de los anticuerpos anti-Siglec-15 se puede probar en monos o utilizando células aisladas de monos. Por lo tanto, los ensayos de potencia pueden adaptarse según la especificidad del anticuerpo (por ejemplo, hacia Siglec-15 humano, de mono y/o de ratón).

De acuerdo con una realización de la invención, el anticuerpo puede interferir con la capacidad del polipéptido para promover la diferenciación de osteoclastos y/o la resorción ósea. De acuerdo con otra realización de la invención, el anticuerpo puede interferir con la capacidad del polipéptido para promover el crecimiento del tumor.

El anticuerpo de la presente invención puede ser capaz de interferir con (inhibir) la diferenciación de una célula precursora de osteoclasto en un osteoclasto diferenciado.

En el presente documento se describe un anticuerpo humanizado en el que se han reintroducido aminoácidos no humanos (por ejemplo, uno o más aminoácidos de la contraparte del anticuerpo de ratón). Por lo tanto, la descripción proporciona un anticuerpo humanizado de un anticuerpo parental no humano (por ejemplo, un anticuerpo de ratón) que es capaz de unirse específicamente a Siglec-15.

Un anticuerpo humanizado como se describe en el presente documento puede comprender una región variable de cadena pesada que puede incluir residuos de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad no humana y residuos de aminoácidos de la región marco humana de un anticuerpo humano natural y una cadena ligera complementaria.

Un anticuerpo humanizado o híbrido como se describe en el presente documento puede comprender una región variable de cadena ligera que puede incluir residuos de aminoácidos de la región determinante de complementariedad no humana y residuos de aminoácidos de la región marco humana de un anticuerpo humano natural y una cadena pesada complementaria.

El término "anticuerpo híbrido" se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una región variable de cadena pesada o ligera humanizada o humana (que tiene afinidad por Siglec-15) y al menos una región variable de cadena ligera o pesada no humana (por ejemplo, de un ratón, rata, conejo).

El anticuerpo humano natural que se selecciona para la humanización del anticuerpo parental no humano puede comprender una región variable que tiene una estructura tridimensional similar a la de (superponible a) una región variable (modelada) del anticuerpo parental no humano.

Como tal, el anticuerpo humanizado o híbrido tiene una mayor probabilidad de tener una estructura tridimensional similar a la del anticuerpo parental no humano.

Los residuos de aminoácidos de la región marco humana de la cadena ligera del anticuerpo humanizado o híbrido pueden ser de una región marco de la cadena ligera del anticuerpo humano natural. La región marco de cadena ligera del anticuerpo humano natural seleccionado para propósitos de humanización puede tener, por ejemplo, al menos un 70% de identidad con una región marco de cadena ligera del anticuerpo parental no humano. Preferiblemente, el anticuerpo humano natural seleccionado para propósitos de humanización puede tener el mismo o sustancialmente el mismo número de aminoácidos en su región determinante de complementariedad de cadena ligera a la de una región determinante de complementariedad de cadena ligera del anticuerpo parental no humano. Los residuos de aminoácidos de la región marco humana de la cadena ligera del anticuerpo humanizado o híbrido pueden ser de una región marco de la cadena ligera del anticuerpo humano natural que tenga al menos 70, 75, 80, 85% de identidad (o más) con la región marco de la cadena ligera del anticuerpo parental no humano.

Los residuos de aminoácidos de la región marco humana de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o híbrido pueden ser de una región marco de la cadena pesada del anticuerpo humano natural que tiene al menos un 70% de identidad con una región marco de la cadena pesada del anticuerpo parental no humano. El anticuerpo humano natural seleccionado para propósitos de humanización puede tener el mismo o sustancialmente el mismo número de

aminoácidos en su región determinante de complementariedad de cadena pesada a la de una región determinante de complementariedad de cadena pesada del anticuerpo parental no humano.

5 Los residuos de aminoácidos de la región marco humana de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o híbrido pueden ser de una región marco de la cadena pesada del anticuerpo humano natural que tenga al menos 70, 75, 80, 85% de identidad con la región marco de la cadena pesada del anticuerpo parental no humano.

10 La región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o híbrido puede comprender, por lo tanto, al menos una región determinante de complementariedad no humana.

La región variable de la cadena pesada del anticuerpo humanizado o híbrido puede comprender al menos dos regiones determinantes de complementariedad no humanas o incluso tres regiones determinantes de complementariedad no humanas.

15 La región variable de la cadena ligera puede comprender al menos una región determinante de la complementariedad no humana.

La región variable de la cadena ligera puede comprender al menos dos regiones determinantes de complementariedad no humanas o incluso tres regiones determinantes de complementariedad no humanas.

20 El anticuerpo humanizado puede comprender ventajosamente por lo tanto las seis CDR del anticuerpo no humano. En el caso de un anticuerpo humanizado divalente, las doce CDR pueden ser del anticuerpo no humano.

25 La región constante puede ser de una IgG1 humana.

La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa.

30 El anticuerpo se puede producir en o a partir de una célula de mamífero aislada (distinta de una célula de hibridoma) o en una célula de hibridoma. Un ejemplo de realización de una célula de mamífero aislada es una célula humana.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo de la presente invención puede interferir (inhibir) con la diferenciación de una célula precursora de osteoclasto humano en un osteoclasto humano diferenciado.

35 En un ejemplo de realización, el anticuerpo de la presente invención puede interferir (inhibir) con la diferenciación de una célula precursora de osteoclasto humana primaria en un osteoclasto humano diferenciado.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse para dirigirse generalmente a células que expresan o sobreexpresan Siglec-15, incluidas células óseas y células cancerosas de mama, colon, pulmón, ovario, próstata y riñón, así como células de melanoma y células cancerosas del sistema nervioso central.

40 Más particularmente, los anticuerpos pueden usarse para dirigirse a células de osteoclastos que experimentan diferenciación.

45 La presente invención proporciona en un aspecto de la misma, un anticuerpo (por ejemplo, aislado o sustancialmente purificado) que puede ser capaz de unirse específicamente a la SEQ ID NO: 2.

50 Se describen anticuerpos de diagnóstico y/o terapéuticos que tienen especificidad por la SEQ ID NO: 2. En el presente documento también se describen anticuerpos que tienen la misma especificidad de epítipo que el anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo candidato puede identificarse determinando si se unirá al epítipo al que se unen los anticuerpos descritos en el presente documento y/o realizando ensayos de competición con anticuerpos que se sabe que se unen al epítipo.

55 En el presente documento también se divulga un anticuerpo aislado capaz de competir con el anticuerpo descrito en el presente documento. También se describe un procedimiento de tratamiento y un procedimiento de detección utilizando el anticuerpo de la presente invención.

60 El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos, anticuerpos monoclonales o policlonales. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos multispecíficos tales como anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos humanos suelen estar formados por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden regiones variables y regiones constantes. La región variable de la cadena ligera comprende 3 CDR, identificadas aquí como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 flanqueadas por regiones marco. La región variable de la cadena pesada comprende 3 CDR, identificadas en este documento como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 flanqueadas por regiones marco.

65 Un sitio de unión típico a antígeno comprende las regiones variables formadas por el emparejamiento de una inmunoglobulina de cadena ligera y una inmunoglobulina de cadena pesada. La estructura de las regiones variables del anticuerpo es muy consistente y exhibe estructuras muy similares. Estas regiones variables están compuestas

típicamente por regiones marco relativamente (FR) homólogas entreveradas con tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). La actividad de unión global a menudo está dictada por la secuencia de las CDR. Las FR a menudo desempeñan un papel en el posicionamiento y la alineación adecuados en tres dimensiones de las CDR para la unión óptima del antígeno.

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden originarse, por ejemplo, de un ratón, una rata o cualquier otro mamífero o de otras fuentes tales como a través de tecnologías de ADN recombinante.

10 Los anticuerpos pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento de la pérdida ósea.

15 La terapia ablativa hormonal (tratamiento con fármacos que detienen la producción de hormonas específicas) aumenta el riesgo de fracturas debido a la pérdida ósea. Las terapias hormonales adyuvantes para mujeres con cáncer de mama incluyen antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno) e inhibidores de la aromatasas, que se ha demostrado que aceleran la pérdida ósea y aumentan el riesgo de fractura debido a la supresión del estrógeno. Además, muchos hombres con cáncer de próstata son tratados con terapia de privación de andrógenos (ADT) (por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina [GnRH]) a medida que su cáncer progresa. Los agonistas de GnRH inhiben la producción de testosterona, que actúa como un factor de crecimiento para las células de cáncer de próstata. Sin embargo, este tratamiento también conduce a una disminución de la masa ósea, lo que aumenta el riesgo de fracturas debido a la osteoporosis. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento de la pérdida ósea asociada al tratamiento del cáncer.

20 Los anticuerpos también pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento del cáncer. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos pueden tener usos terapéuticos en la pérdida ósea inducida por el tratamiento del cáncer. Alternativamente, los anticuerpos pueden tener usos terapéuticos en la pérdida ósea asociada con enfermedades óseas tales como condiciones en las que hay un aumento en la actividad degradativa ósea de los osteoclastos. En ciertos casos, los anticuerpos pueden interactuar con las células que expresan la SEQ ID NO: 2 e inducir una reacción inmunológica al mediar la ADCC. En otros casos, los anticuerpos pueden bloquear la interacción de la SEQ ID NO: 2 con sus ligandos naturales. En otros casos más, los anticuerpos pueden inducir la internalización de la proteína y/o su degradación.

30 El anticuerpo de la invención se puede administrar (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente) con otro fármaco útil para el tratamiento de la pérdida ósea, la resorción ósea o útil para el tratamiento de una enfermedad asociada con la pérdida ósea o la resorción ósea.

35 Los anticuerpos capaces de inhibir la pérdida ósea se han descrito en las solicitudes internacionales Nos. PCT/CA2010/001586 publicada con el número WO2011/041894 el 14 de abril de 2011, y PCT/CA2007/000210 publicada con el número WO2007/093042 el 13 de febrero de 2007, así como en el documento EP2377932.

40 Conjugados de anticuerpos

Aunque no siempre es necesario, para fines de detección o terapéuticos, el anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con una fracción detectable (es decir, con fines de detección o diagnóstico) o con una fracción terapéutica (con fines terapéuticos).

45 Para fines de detección, se puede usar un anticuerpo no conjugado (anticuerpo primario) para unirse al antígeno y se puede agregar un anticuerpo secundario que porta una fracción detectable y capaz de unirse al anticuerpo primario. Sin embargo, como se indicó anteriormente, el anticuerpo anti-SIGLEC 15 puede conjugarse con un marcador detectable y, como tal, puede no ser necesario un anticuerpo secundario.

50 Una "fracción detectable" es una fracción detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos y/u otros medios físicos. Una fracción detectable se puede acoplar directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlace, tal como, sin limitación, un enlace DOTA o NHS) a los anticuerpos de la presente invención usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Se puede usar una amplia variedad de fracciones detectables, dependiendo la elección de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación, los requisitos de estabilidad y la instrumentación disponible. Una fracción detectable adecuada incluye, pero no se limita a, una etiqueta fluorescente, una etiqueta radioactiva (por ejemplo, sin limitación, ^{125}I , In^{111} , Tc^{99} , I^{131} e incluyendo isótopos emisores de positrones para el escáner PET, etc.), una etiqueta activa de resonancia magnética nuclear, una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta de cromóforo, una etiqueta enzimática (por ejemplo, y sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), puntos cuánticos y/o nanopartículas. La fracción detectable puede causar y/o producir una señal detectable, permitiendo así que se detecte una señal de la fracción detectable.

60 En otro ejemplo de realización de la invención, el anticuerpo puede estar acoplado (modificado) con una fracción terapéutica (por ejemplo, fármaco, fracción citotóxica).

65

En algunos casos, con fines terapéuticos, un anticuerpo no conjugado puede por sí mismo ser capaz de secuestrar el antígeno, puede bloquear una interacción importante entre el antígeno y otro compañero de unión, puede reclutar células efectoras, etc. Sin embargo, como se indicó anteriormente, el anticuerpo puede conjugarse con una fracción terapéutica.

5 En un ejemplo de realización, los anticuerpos pueden comprender un agente quimioterapéutico o citotóxico. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar conjugado con el agente quimioterapéutico o citotóxico. Dichos agentes quimioterapéuticos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, itrio 90, escandio 47, renio 186, yodo 131, yodo 125 y muchos otros reconocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, lutecio (por ejemplo, Lu¹⁷⁷), bismuto (por ejemplo, Bi²¹³), cobre (por ejemplo, Cu⁶⁷)). En otros casos, el agente quimioterapéutico o citotóxico puede comprender, entre otros conocidos por los expertos en la técnica, 5-fluorouracilo, adriamicina, irinotecano, auristatinas, taxanos, endotoxina de *Pseudomonas*, ricina, caliqueamicina y otras toxinas. Los ejemplos de agentes citotóxicos pueden comprender particularmente un agente, que es capaz de destruir células no proliferativas.

15 El anticuerpo de la presente invención se puede conjugar especialmente con agentes dirigidos al ADN. Ejemplos de realizaciones de agentes dirigidos al ADN incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes tales como duocarmicinas y derivados de duocarmicina tales como adozelesina, bizelesina, carzelesina, etc. Otros ejemplos de realizaciones de agentes dirigidos al ADN incluyen, por ejemplo, caliqueamicina, esperamicina y derivados (véase los compuestos descritos por ejemplo en las patentes estadounidenses Nos. 5.264.586, 5.108.192, 4.970.198, 5.037.651, 5.079.233, 20 4.675.187, 4.539.203, 4.554.162, 4.837.206 y el documento US2007213511).

Una realización particular de la invención incluye, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento conjugado con duocarmicina. Otra realización particular de la invención incluye, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento conjugado con caliqueamicina. Alternativamente, para llevar a cabo los procedimientos de la presente invención y como se conoce en la técnica, el anticuerpo de la presente invención (conjugado o no) se puede usar en combinación con una segunda molécula (por ejemplo, un anticuerpo secundario, etc.) que puede unirse específicamente al anticuerpo de la presente invención y que puede portar una fracción detectable, de diagnóstico o terapéutico deseable.

30 Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos y su uso

Las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos (conjugados o no) también están abarcadas por la presente invención. La composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo y también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Otros aspectos de la invención se refieren a una composición que puede comprender el anticuerpo descrito en el presente documento y un vehículo.

40 Otros aspectos de la invención se relacionan con el uso del anticuerpo aislado descrito en el presente documento en el tratamiento de la pérdida ósea.

Además de los ingredientes activos, una composición farmacéutica puede contener vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden agua, PBS, soluciones salinas, gelatinas, aceites, alcoholes y otros excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. En otros casos, tales preparaciones pueden ser esterilizadas.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" normalmente comprende cantidades terapéuticamente eficaces del agente junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una condición y un régimen de administración dados. Dichas composiciones son líquidas o formulaciones liofilizadas o secas e incluyen diluyentes de varios contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos como la albúmina o la gelatina para evitar la absorción en las superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares). Agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilén glicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias a granel o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), unión covalente de polímeros como el polietilenglicol a la proteína, complejación con iones metálicos o incorporación del material en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). La invención también comprende composiciones en partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan revestimientos protectores en forma de partículas, inhibidores de la proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluidas las vías parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal y rectal. En una realización, la composición farmacéutica se administra por

vía parenteral, paracancerígena, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

Además, como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéutico" son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a tampón de fosfato 0,01-0,1 M o 0,05 M o solución salina al 0,8%. Además, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites de Ringer con lactato o fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos como los que se basan en la dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de intercalación, gases inertes y similares.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales tales como ratones, ratas, conejos, perros o cerdos. También se puede utilizar un modelo animal para determinar el intervalo de concentración y la vía de administración. Dicha información se puede usar para determinar las dosis útiles y las vías de administración en humanos. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica y una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de ingrediente activo que mejora los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o con animales de experimentación, como el cálculo y el contraste de la estadística de DE_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población). Cualquiera de las composiciones terapéuticas descritas anteriormente se puede aplicar a cualquier sujeto que necesite tal terapia, incluidos, entre otros, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos y seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención pueden administrarse por cualquier cantidad de rutas que incluyen, pero no se limitan a, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, o rectal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender además, por ejemplo, al menos un miembro farmacológico seleccionado del grupo que consiste en bifosfonatos, vitamina D3 activa, calcitonina y derivados de los mismos, preparaciones hormonales tales como estradiol, SERM (moduladores selectivos del receptor de estrógeno), ipriflavona, vitamina K2 (menatetreona), preparaciones de calcio, preparaciones de PTH (hormona paratiroidea), agentes antiinflamatorios no esteroideos, preparaciones solubles del receptor de TNF, anticuerpos anti-TNF-alfa, anticuerpos anti-PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea), antagonistas del receptor de IL-1, anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos anti-RANKL y OCIF (factor inhibidor de la osteoclastogénesis).

El término "tratamiento" para los fines de esta divulgación se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico objetivo. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en quienes se va a prevenir el trastorno.

Los anticuerpos pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento de diversas pérdidas óseas. En un ejemplo de realización, los anticuerpos pueden tener usos terapéuticos en la pérdida ósea asociada con enfermedades óseas tales como afecciones en las que hay un aumento en la actividad degradativa ósea de los osteoclastos.

En ciertos casos, los anticuerpos anti-Siglec-15 pueden interactuar con células, como los osteoclastos o los precursores de osteoclastos, que expresan Siglec-15. En ciertos casos, los anticuerpos pueden interactuar con las células que expresan la SEQ ID NO: 2 e inducir una reacción inmunológica al mediar la ADCC. En otros casos, los anticuerpos pueden bloquear la interacción de la SEQ ID NO: 2 con sus ligandos naturales.

Los anticuerpos anti-Siglec-15 pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento de la pérdida ósea en el contexto de diversas enfermedades relacionadas con los huesos, que incluyen, entre otras, osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hiperadrenocorticismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipercalcemia, hipocalcemia, hipocalcemia, artritis, enfermedad periodontal, raquitismo (incluido el raquitismo dependiente de la vitamina D, tipo I y II, y el hipofosfatémico ligado al cromosoma X), fibrogénesis imperfecta ossium, trastornos osteoscleróticos tales como picnodisostosis y daños causados por procesos inflamatorios mediados por macrófagos. En la realización preferida, los anticuerpos tienen usos terapéuticos en condiciones en las que prevalece una pérdida ósea grave, en particular cáncer metastásico en el hueso.

Los anticuerpos anti-Siglec-15 pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento del cáncer o la pérdida ósea causada por o asociada con diversos trastornos de remodelación ósea. En particular, los anticuerpos anti-Siglec-15 tienen usos terapéuticos en condiciones donde los osteoclastos son hiperactivos y contribuyen a la degradación de la superficie ósea. En ciertos casos, los anticuerpos anti-Siglec-15 pueden administrarse simultáneamente en combinación con otros tratamientos administrados para la misma condición. Como tales, los anticuerpos pueden administrarse con antirresortivos (por ejemplo, bifosfonatos) que son conocidos por los expertos en la técnica. Además, los anticuerpos pueden administrarse con antimitóticos (por ejemplo, taxanos), agentes a base de platino (por ejemplo, cisplatino), agentes que dañan el ADN (por ejemplo, doxorubicina) y otras terapias citotóxicas que son conocidas por los expertos en la técnica. En otros casos, los anticuerpos anti-Siglec-15 pueden administrarse con otros anticuerpos terapéuticos. Estos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos dirigidos a RANKL, EGFR, CD-20 y Her2.

El alcance, la aplicabilidad y las ventajas adicionales de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada no restrictiva que se proporciona a continuación. Debe entenderse, sin embargo, que esta descripción detallada, aunque indica ejemplos de realizaciones de la invención, se proporciona solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A. Modelo molecular del dominio variable 25D8 murino. Los bucles de CDR se indican con flechas como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada.

Figura 1B. Modelo molecular del dominio variable 25E9 murino. Los bucles de CDR se indican con flechas como L1, L2 y L3 en la cadena ligera y H1, H2 y H3 en la cadena pesada.

Figura 2A. Alineación de secuencia de las secuencias marco humanizadas y humanas seleccionadas de ratón para el dominio ligero variable (VL) del anticuerpo 25D8. Las CDR se resaltan en gris claro y corresponden a las SEQ ID NOs: 53, 54 y 55.

Figura 2B. Alineación de secuencia de las secuencias marco humanizadas y humanas seleccionadas de ratón para el dominio pesado variable (VH) del anticuerpo 25D8. Las CDR se resaltan en gris claro y corresponden a las SEQ ID NOs: 56, 57 y 58.

Figura 3A. Alineación de secuencia de las secuencias marco humanizadas y humanas seleccionadas de ratón para el dominio ligero variable (VL) del anticuerpo 25E9. Las CDR se resaltan en gris claro y corresponden a las SEQ ID NOs: 47, 48 y 49.

Figura 3B. Alineación de secuencia de las secuencias marco humanizadas y humanas seleccionadas de ratón para el dominio pesado variable (VH) del anticuerpo 25E9. Las CDR se resaltan en gris claro y corresponden a las SEQ ID NOs: 50, 51 y 52.

Figura 4A. Secuencias ensambladas de los anticuerpos IgG2 25D8 humanizados de longitud completa (SEQ ID NOs: 23 y 27) y los anticuerpos IgG2 25D8 quiméricos de longitud completa (SEQ ID NOs: 21 y 25).

Figura 4B. Secuencias ensambladas de los anticuerpos IgG2 25E9 humanizados de longitud completa (SEQ ID NOs: 7 y 29) y los anticuerpos IgG2 25E9 quiméricos de longitud completa (SEQ ID NOs: 5 y 30).

Figura 5A. Cromatogramas de SPR de los anticuerpos IgG2 25D8 humanizados y de ratón.

Figura 5B. Cromatogramas de SPR de los anticuerpos IgG2 25E9 humanizados y de ratón.

La Figura 6A ilustra la alineación entre el dominio variable de la cadena ligera de ratón 25E9 y la variante 1 del dominio variable de la cadena ligera humanizada de 25E9. La alineación se hizo utilizando el programa ClustalW2; en el que "*" significa que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en la alineación, ":" significa que se han observado sustituciones conservadas y "." significa que se observan sustituciones semiconservadas (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW y ClustalX versión 2. Bioinformatics 2007 23 (21): 2947-2948). Estas alineaciones se usaron para generar las secuencias de consenso establecidas en las SEQ ID NOs: 33, 34 y 35.

La Figura 6B ilustra la alineación entre el dominio variable de la cadena pesada de ratón 25E9 y la variante 1 del dominio variable de la cadena pesada humanizada de 25E9 utilizando el programa ClustalW2; en el que "*" significa que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en la alineación, ":" significa que se han observado sustituciones conservadas y "." significa que se observan sustituciones semiconservadas. (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW y ClustalX versión 2. Bioinformatics 2007 23 (21): 2947-2948). Estas alineaciones se utilizaron para generar las secuencias de consenso establecidas en las SEQ ID NOs: 36, 37 y 38.

La Figura 7A ilustra la alineación entre el dominio variable de la cadena ligera de ratón 25D8 y el dominio variable de la cadena ligera humanizada de 25D8. La alineación se realizó utilizando el programa ClustalW2; en el que "*" significa que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en la alineación, ":" significa que se han observado sustituciones conservadas y "." significa que se observan sustituciones semiconservadas. (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW y ClustalX versión 2. *Bioinformatics* 2007 23 (21): 2947-2948). Estas alineaciones se usaron para generar las secuencias de consenso expuestas en las SEQ ID NOs: 39, 40 y 41.

La Figura 7B ilustra la alineación entre el dominio variable de la cadena pesada de ratón 25D8 y el dominio variable de la cadena pesada humanizada de 25D8. La alineación se realizó utilizando el programa ClustalW2; en el que "*" significa que los residuos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en la alineación, ":" significa que se han observado sustituciones conservadas y "." significa que se observan sustituciones semiconservadas. (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW y ClustalX versión 2. *Bioinformatics* 2007 23 (21): 2947-2948). Estas alineaciones se utilizaron para generar las secuencias de consenso establecidas en las SEQ ID NOs: ...42, 43 y 44.

Figura 8. Los resultados de la citometría de flujo indican que 25E9 se une específicamente a Siglec-15 humano expresado en la superficie de las células de una manera dependiente de la concentración.

Figura 9. Imágenes que muestran la capacidad de 25E9 para inhibir la diferenciación y la actividad de resorción de los osteoclastos humanos.

Figura 10A. Transferencia Western que muestra la internalización de Siglec-15 biotinilado en presencia del anticuerpo anti-Siglec-15.

Figura 10B. Caracterización de la endocitosis de Siglec-15 mediante microscopía confocal.

Figura 10C. Transferencia Western que muestra los niveles de proteína Siglec-15.

Figura 10D. Transferencia Western que muestra la expresión de la proteína Siglec-15 en RAW264.7 después de la estimulación con RANK1 en presencia o ausencia de anticuerpo anti-Siglec-15.

Figura 11. Análisis de la señalización celular inducida por la agrupación de Siglec-15. Las células de control (C) o diferenciadas (Δ) RAW264.7 se trataron con anticuerpo primario (anti-Siglec-15 o IgG humana de control) a 4°C seguido de un anticuerpo de entrecruzamiento secundario durante los tiempos indicados a 37°C. Se analizaron los lisados totales por transferencia Western con los anticuerpos indicados.

Figura 12. Cromatogramas de SPR que ilustran las diferencias en los parámetros de unión entre la IgG1 L1H1 25E9 humanizada (panel izquierdo) y la IgG2 L1H1 25E9 humanizada (panel derecho). El Fc-Siglec-15 purificado se inmovilizó (150RU) y se inyectó 25E9 humanizado en las concentraciones indicadas (100 nM, 33,3 nM, 11,1 nM, 3,70 nM y 1,23 nM). Las curvas se ajustaron con una relación 1:1.

Figura 13. Imágenes representativas que muestran la potencia aumentada de la IgG1 L1H1 25E9 humanizada en comparación con la IgG2 25E9 humanizada para inhibir la diferenciación de los osteoclastos.

Figura 14A. Secuencias ensambladas de los anticuerpos IgG1 25D8 (SEQ ID NOs: 23 y 46) humanizados de longitud completa y los anticuerpos IgG1 25D8 (SEQ ID NOs: 21 y 45) de longitud completa quiméricos.

Figura 14B. Secuencias ensambladas de los anticuerpos IgG1 25E9 (SEQ ID NOs: 7 y 13) humanizados de longitud completa y los anticuerpos IgG1 25E9 (SEQ ID NOs: 5 y 11) de longitud completa quiméricos.

Figura 15. Los resultados de la citometría de flujo indican que el 25E9-ADC se une específicamente a Siglec-15 humano expresado en la superficie de las células de una manera muy similar al anticuerpo no conjugado.

Figura 16. Muestra las curvas de supervivencia del 25E9-ADC frente a osteoclastos maduros, multinucleados. La respuesta es muy diferente al 25E9 no conjugado, que inhibe fuertemente la actividad de los osteoclastos sin afectar su supervivencia.

La Figura 17 muestra imágenes de osteoclastos teñidos con TRAP para ilustrar los efectos citotóxicos del 25E9-ADC contra osteoclastos maduros, multinucleados. La respuesta es muy diferente al 25E9 no conjugado, que inhibe fuertemente la actividad de los osteoclastos sin afectar su supervivencia. Un control-ADC no tiene ningún efecto contra los osteoclastos.

Descripción detallada de la invención

Las variantes de anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender una inserción, una eliminación o una sustitución de aminoácidos (conservadora o no conservadora). Estas variantes pueden tener al menos un residuo de aminoácido en su secuencia de aminoácidos eliminada y un residuo diferente insertado en su lugar.

5 Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables (CDR), pero también se contemplan modificaciones en la región marco o incluso en la región constante. Se pueden hacer sustituciones conservadoras intercambiando un aminoácido (de una CDR, cadena variable, anticuerpo, etc.) de uno de los grupos enumerados a continuación (grupo 1 a 6) por otro aminoácido del mismo grupo.

10 En general, las mutaciones en las CDR pueden tener un mayor impacto en la actividad de unión al antígeno del anticuerpo que las mutaciones en la región marco. La mutación en la región marco se puede realizar para aumentar la "condición humana" del anticuerpo. Las variantes de anticuerpos que se describen en este documento son aquellas que tienen una capacidad de unión a antígeno sustancialmente idéntica (que incluye similar, idéntico o ligeramente menor) a los presentados en este documento o tienen una mejor capacidad de unión a antígeno que los presentados en este documento.

15 Otro ejemplo de realización de sustituciones conservadoras se muestra en la **Tabla 1A** debajo del encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado una propiedad no deseada, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "ejemplos de sustituciones" en la **Tabla 1A**, o como se describe más adelante con referencia a las clases de aminoácidos, y los productos seleccionados.

20 Se sabe en la técnica que pueden generarse variantes por mutagénesis de sustitución y retener la actividad biológica de los polipéptidos descritos en el presente documento. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos eliminada y un residuo diferente insertado en su lugar. Por ejemplo, un sitio de interés para mutagénesis sustitutiva puede incluir un sitio en el que los residuos particulares obtenidos de varias especies sean idénticos. Los ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservadoras" se muestran en la **Tabla 1A**. Si tales sustituciones resultan en un cambio no deseado, entonces se introducen otro tipo de sustituciones, denominadas "ejemplos de sustituciones" en la **Tabla 1A**, o como se describe aquí con referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

25 Las modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica se logran mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura de la cadena polipeptídica principal en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos según las propiedades comunes de la cadena lateral:

30 (grupo 1) hidrofóbico: norleucina, metionina (Met), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile)
 (grupo 2) hidrofílico neutro: cisteína (Cys), serina (Ser), treonina (Thr)
 (grupo 3) ácido: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu)
 40 (grupo 4) básico: asparagina (Asn), glutamina (ginebra), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg)
 (grupo 5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: glicina (Gly), prolina (Pro); y
 (grupo 6) aromático: triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe)

45 Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra.

Tabla 1A. Sustitución de aminoácidos

Residuo original	Ejemplo de sustitución	Sustitución conservadora	Sustitución semiconservadora
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val	N, V, P, (C)
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys	S, T, E, D, A
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln	K, R
Asp (D)	Glu, Asn	Glu	K, R, H, A
Cys (C)	Ser, Ala	Ser	F, G
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn	M, L, K, R
Glu (E)	Asp, Gln	Asp	K, R, H, A
Gly (G)	Ala	Ala	-
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg	L, M, A, (C)

(continuación)

Residuo original	Ejemplo de sustitución	Sustitución conservadora	Sustitución semiconservadora
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu	F, Y, W, G, (C)
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile	F, Y, W, H, (C)
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg	Q, N, S, T, D, E, A
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu	Q, F, Y, W, (C), (R), (K), (E)
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr	I, V, (C)
Pro (P)	Ala	Ala	A, (C), (D), (E), F, H, (K), L, M, N, Q, (R), S, T, W, Y
Ser (S)	Thr	Thr	D, E, R, K
Thr (T)	Ser	Ser	D, E, R, K, I
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr	L, M, I, V, (C)
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe	L, M, I, V, (C)
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu	P, (C)

El cambio de A, F, H, I, L, M, P, V, W o Y a C es semiconservador si la cisteína permanece como un tiol libre. El cambio de M a E, R, K es semiconservador si la punta iónica del nuevo grupo lateral puede alcanzar la superficie de la proteína mientras que los grupos metileno hacen contacto hidrofóbico. Cambiar de P a uno de K, R, E o D es semiconservador si el grupo lateral está en o cerca de la superficie de la proteína.

5 La variación en la secuencia de aminoácidos de la variante de anticuerpo puede incluir una adición, eliminación, inserción, sustitución, etc. de aminoácidos, una o más modificaciones en la cadena principal o la cadena lateral de uno o más aminoácidos, o una adición de un grupo u otra molécula a uno o más aminoácidos (cadenas laterales o cadena principal).

10 La variante de anticuerpo puede tener una similitud de secuencia sustancial y/o identidad de secuencia en su secuencia de aminoácidos en comparación con la de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en el porcentaje de identidades (aminoácidos idénticos) y de la sustitución conservadora.

15 En general, el grado de similitud e identidad entre cadenas variables se ha determinado en el presente documento utilizando el programa de secuencias Blast2 (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250) usando la configuración predeterminada, es decir, el programa de blastp, la matriz BLOSUM62 (hueco abierto 11 y penalización por extensión del hueco 1; disminución del hueco 50, esperado 10,0, tamaño de palabra 3) y filtros activados.

20 Por lo tanto, el porcentaje de identidad puede ser indicativo de aminoácidos que son idénticos en comparación con el péptido original y que pueden ocupar la misma posición o una similar. El porcentaje de similitud puede ser indicativo de aminoácidos que son idénticos y aquellos que se reemplazan con una sustitución de aminoácidos conservadora en comparación con el péptido original en la misma posición o similar.

25 Las variantes (es decir, los análogos) (incluidas las variantes de VL, las variantes de VH, las variantes de CDR, las variantes de anticuerpos, las variantes de polipéptidos, etc.) comprenden, por lo tanto, aquellas que pueden tener al menos el 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

30 Una variante de la SEQ ID NO: 2 puede incluir un polipéptido que tiene una región al menos 80% idéntica con los aminoácidos 49-165 o con los aminoácidos 20 a 259 de la SEQ ID NO: 2. Las variantes de la SEQ ID NO: 2 también incluyen polipéptidos que tienen al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 2 incluyen aquellas que son capaces de inhibir la diferenciación de osteoclastos y/o la resorción ósea. Dichas variantes pueden identificarse, por ejemplo, probando su diferenciación de osteoclastos y/o su actividad de resorción ósea *in vitro* o *in vivo*. Ejemplos de procedimientos o ensayos que pueden usarse para

35

probar la actividad de las variantes de Siglec-15 se describen en el presente documento y se han proporcionado en la solicitud internacional No. PCT/CA2007/001134. Debe entenderse que el osteoclasto usado para realizar los ensayos descritos en el presente documento puede originarse, por ejemplo, preferiblemente en humanos pero también en ratones. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 2 pueden incluir, por ejemplo, aquellas en las que se conserva un epítipo que comprende arginina 99 (R99) de la SEQ ID NO: 2.

Los ejemplos de realizaciones de variantes son aquellas que tienen al menos un 81% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Otros ejemplos de realizaciones de variantes son aquellas que tienen al menos un 82% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y un 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Otros ejemplos de realizaciones de variantes son aquellas que tienen al menos un 85% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en este documento y un 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original. Otros ejemplos de realizaciones de variantes son aquellas que tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Ejemplos de realizaciones adicionales de variantes son aquellas que tienen al menos un 95% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Aún otro ejemplo adicional de realizaciones de variantes son aquellas que tienen al menos un 97% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y un 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Para un propósito de concisión, el solicitante proporciona en este documento una Tabla 1B que ilustra ejemplos de realizaciones de variantes individuales y que comprende el % de identidad de secuencia y el % de similitud de secuencia especificados. Cada "X" debe interpretarse como que define una variante dada.

Tabla 1B		Porcentaje (%) de identidad de secuencia																					
Porcentaje (%) de similitud de secuencia		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	
	80	X																					
	81	X	X																				
	82	X	X	X																			
	83	X	X	X	X																		
	84	X	X	X	X	X																	
	85	X	X	X	X	X	X																
	86	X	X	X	X	X	X	X															
	87	X	X	X	X	X	X	X	X														
	88	X	X	X	X	X	X	X	X	X													
	89	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
	90	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
	92	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	93	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
	94	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
	95	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
	97	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
	98	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
99	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

Como se usa en el presente documento, el término "idéntico" significa que una secuencia comparte una identidad de secuencia del 100% con otra secuencia.

5 Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente idéntica" significa que una secuencia comparte 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia con otra secuencia o una parte de otra secuencia.

10 En el presente documento se describen CDR, dominios variables de cadena ligera, dominios variables de cadena pesada, cadenas ligeras, cadenas pesadas, anticuerpos que comprenden al menos 70% de identidad (incluyendo cualquier intervalo entre 70% y 99%) con la secuencia descrita en este documento.

15 La presente invención se refiere al uso de anticuerpos monoclonales para direccionarlos a los osteoclastos encontrados en diversas enfermedades relacionadas con los huesos, en las que se observa una pérdida ósea grave debido al aumento de la actividad de los osteoclastos. Para dirigir los anticuerpos a los osteoclastos, se debe llevar a cabo la identificación de antígenos específicos de osteoclastos que se expresan en la superficie celular de las células. Existen varias tecnologías disponibles para identificar antígenos específicos de células y el procedimiento que se utilizó para identificar Siglec-15 en la diferenciación de osteoclastos que se trataron con RANKL, una

20 plataforma de descubrimiento innovadora llamada amplificación de ARNm basada en la transcripción sustractiva (STAR), es descrita en la solicitud de patente publicada No. PCT/CA2007/000210.

El análisis de las bibliotecas de osteoclastos humanos mediante STAR produjo muchos genes que codifican proteínas secretadas y de superficie celular. Uno de estos, denominado 0326-SL109, contenía un marco de lectura abierto que codificaba un polipéptido de 328 aminoácidos, correspondiente a la SEQ ID NO: 2 que estaba codificada por un ADNc de 987 pares de bases con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Una búsqueda en bases de datos disponibles públicamente reveló que la secuencia de nucleótidos 0326-SL109 era idéntica a la de un gen humano llamado variante 3 del antígeno CD33 (CD33L3). Más tarde se descubrió que CD33L3 era un miembro de la familia Siglec de proteínas de unión al ácido siálico y se le cambió el nombre a Siglec-15 por su homología con otros Siglec (Crocker et al., 2007). Basándose en esta información, el ortólogo de ratón se aisló y se secuenció y se encontró que era aproximadamente un 85% idéntico a la secuencia humana a nivel de aminoácidos. La SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4 muestran las secuencias de ADNc y del polipéptido del Siglec-15 murino, respectivamente. El análisis bioinformático predijo una proteína anclada a la membrana de tipo I que presenta su dominio funcional al compartimento extracelular. Al igual que con otras secuencias de Siglec, un péptido señal en el extremo terminal amino (ubicado entre los aminoácidos 1 y 19 de la SEQ ID NO: 2) dirige la proteína a la membrana de las células y la proteína procesada final se ancla a la membrana a través de una única hélice transmembrana ubicada en el extremo terminal carboxilo (ubicado entre los aminoácidos 261 y 283 de la SEQ ID NO: 2). El dominio de la Ig del conjunto V está ubicado entre los aminoácidos 49 y 165 de la SEQ ID NO: 2, mientras que el dominio de la Ig del conjunto C2 está ubicado entre los aminoácidos 78 y 244 de la SEQ ID NO: 2.

Los hallazgos previos (Sooknanan et al. 2007) establecieron que el transcripto que codifica Siglec-15 humano se sobreexpresó significativamente en respuesta a RANKL. Esta determinación se realizó en macroarreglos de ARN que contenían muestras de ARN total marcado de varios experimentos diferentes de diferenciación de osteoclastos humanos de diferentes donantes de PBMNC humanas. Además, estos estudios (Sooknanan et al. 2007) revelaron que el transcripto de Siglec-15 se expresó en un solo tejido normal entre un vasto panel de 30 tejidos humanos normales, lo que indica una especificidad de osteoclastos muy alta de la expresión del gen Siglec-15. Usando procedimientos más sensibles, tales como la RT-PCR semicuantitativa, la expresión del ARNm de Siglec-15 se estimuló en el transcurso de un día de tratamiento con RANKL en muchas muestras de osteoclastos, lo que indica que el gen se expresó temprano en las células precursoras de osteoclastos, antes del comienzo de la fusión celular. Finalmente, el perfil de expresión tisular de Siglec-15 se evaluó mediante RT-PCR semicuantitativa y se encontró que solo se expresaba en un solo tejido humano normal, validando así los resultados de macroarreglos de Sooknanan et al. En conjunto, estos resultados de expresión subrayan la fuerza del enfoque de descubrimiento del solicitante en su capacidad para identificar objetivos, como lo ejemplifica Siglec-15, que están altamente restringidos para diferenciar osteoclastos.

Con base en la expresión de Siglec-15 en las primeras etapas de diferenciación de los osteoclastos, su expresión limitada en tejidos normales y un papel biológico crítico para Siglec-15 en la actividad de los osteoclastos, se eligió a Siglec-15 como un agente terapéutico objetivo para el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección, prevención y tratamiento de la resorción ósea o enfermedades relacionadas con los huesos, como la pérdida ósea inducida por cáncer, osteoporosis, pérdida ósea asociada con el tratamiento del cáncer.

Por lo tanto, se proporciona una variedad de anticuerpos anti-Siglec-15, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio y polipéptidos con una región de unión a antígeno, para direccionamiento a Siglec-15.

De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos pueden ser particularmente capaces de inhibir la diferenciación de osteoclastos. Además, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos pueden inhibir la formación de osteoclastos.

También de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos pueden ser capaces de inhibir la actividad de los osteoclastos.

Además, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos pueden inhibir la resorción ósea (por ejemplo, la actividad de resorción ósea de los osteoclastos).

En este documento se describe un anticuerpo capaz de unirse específicamente a Siglec-15 que puede tener una región variable de cadena ligera al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 6 y/o una región variable de cadena pesada al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 12. El anticuerpo también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 12.

En el presente documento se describe un anticuerpo que puede tener una región variable de cadena ligera al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 22 y/o una región variable de cadena pesada al menos el 80% idéntica a la SEQ ID NO: 26. El anticuerpo también puede comprender al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 22 o la SEQ ID NO: 26.

La sustitución de aminoácidos puede ser un aminoácido que aparece en una posición correspondiente en un anticuerpo humano natural.

La sustitución de aminoácidos puede estar fuera de una región determinante de complementariedad (CDR).

La sustitución de aminoácidos puede estar localizada, por ejemplo, en la región variable de la cadena ligera.

5 El anticuerpo puede comprender al menos dos o al menos tres sustituciones de aminoácidos. Dichas sustituciones de aminoácidos pueden estar ubicadas en la misma región variable o pueden estar ubicadas en regiones variables distintas.

10 El anticuerpo puede comprender, por ejemplo, de una a veinticinco sustituciones de aminoácidos en la región variable de la cadena ligera y/o en la región variable de la cadena pesada. Más particularmente, el anticuerpo puede tener, por ejemplo, de uno a veintidós sustituciones de aminoácidos en su región variable de cadena ligera y de una a veinticinco sustituciones de aminoácidos en su región variable de cadena pesada. Los anticuerpos que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad de la SEQ ID NO: 6 y las regiones determinantes de la complementariedad de la SEQ ID NO: 12 y que comprenden los aminoácidos estructurales de un anticuerpo humano se contemplan particularmente, tales como, por ejemplo, un anticuerpo humanizado.

15 Se contemplan particularmente los anticuerpos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad de la SEQ ID NO: 22 y las regiones determinantes de complementariedad de la SEQ ID NO: 26 y que comprenden aminoácidos del marco de un anticuerpo humano.

20 En este documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 33 (dominio variable de cadena ligera de 25E9 genérico (consenso 1)).

DIVMTQXXXSPVTPGEXXSISCRSTKSLLSNGNTLYWXLQXPGQSPQLLIY
R MSNLAGVPPDRFSGSGSGTXFTLXISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKXEIK
(SEQ ID NO.:33);

25 en el que al menos uno del aminoácido identificado por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 6 (la VL de ratón). La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservadora o no conservadora.

30 En este documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 34 (dominio variable de cadena ligera de 25E9 genérico (consenso 2)).

35 DIVMTQX_{a1}X_{a2}X_{a3}SX_{a4}PVTPGEX_{a5}X_{a6}SISCRSTKSLLSNGNTLYWX_{a7}LQX_{a8}P
GQSPQLLIPVRMSNLAGVPPDRFSGSGTX_{a9}FTLX_{a10}ISRVEAEDVGVYYCMQHLEYP FTFGGGTX_{a11}EI (SEQ ID NO: 34);

en la que al menos uno del aminoácido identificado por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 6 (la VL de ratón) y; en la que Xa1, Xa4, Xa7, Xa8, Xa10 y Xa11 pueden ser cada uno independientemente una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 6;

40 en la que Xa2, Xa5, Xa6 pueden ser cada uno independientemente una sustitución de aminoácidos semiconservadora en comparación con la SEQ ID NO: 6;

en la que Xa3 puede ser P o L; y

en la que Xa9 puede ser A o D.

45 En este documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 35 (dominio variable de cadena ligera de 25E9 genérico (consenso 3)).

50 DIVMTQX_{a1}X_{a2}X_{a3}SX_{a4}PVTPGEX_{a5}X_{a6}SISCRSTKSLLSNGNTLYWX_{a7}LQX_{a8}P
GQSPQLLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSGTX_{a9}FTLX_{a10}ISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPF TFGGGTX_{a11}EIK (SEQ ID NO: 35);

en la que al menos uno del aminoácido identificado por X (incluyendo Xa1 a Xa11) puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 6 (el VL de ratón) y

en la que Xa1 puede ser A o S;

en la que Xa2 puede ser A o P;

55 en la que Xa3 puede ser P o L;

en la que Xa4 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, V o L);

en la que Xa5 puede ser S o P;

en la que Xa6 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, V o A);

en la que Xa7 puede ser un aminoácido aromático (por ejemplo, F o Y);

60 en la que Xa8 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, R o K);

en la que Xa9 puede ser A o D;

en la que Xa10 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, R o K); y

en la que Xa11 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o V).

En el presente documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 36 (dominio variable de cadena pesada de 25E9 genérico (consenso 1)).

EIQLQQSGXEXXPGXSVXXSCKASGYTFTDYDMHWVXQXPXXGLEWXGTID
 PETGGTAYNQKFKGXXTXTADXSXXTAYMELSSLXSEDXAVYYCTSFYYTYSNYDVG
 5 AYWGQGLTVTSX (SEQ ID NO..36),

en la que al menos uno del aminoácido identificado por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 12 (el VH de ratón). La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservadora o no conservadora.

En el presente documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 37 (dominio variable de cadena pesada de 25E9 genérico (consenso 2)).

EIQLQQSGX_{b1}EX_{b2}X_{b3}X_{b4}PGX_{b5}SVX_{b6}X_{b7}SCKASGYTFTDYDMHWVX_{b8}QX_{b9}PX_{b10}X_{b11}GLEWX_{b12}GTIDPETGGTAYN
 QKFKGX_{b13}X_{b14}TX_{b15}TADX_{b16}SX_{b17}X_{b18}TAYMELSSLX_{b19}
 15 SEDX_{b20}AVYYCTSFYYTYSNYDVGFAWYWGQGLTVTSX_{b21} (SEQ ID NO: 37);

en la que al menos uno del aminoácido identificado por X (incluyendo Xb1 a Xb21) puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 12 (el VH de ratón) y

en la que Xb2, Xb4, Xb5, Xb7, Xb8, Xb9, Xb11, Xb12, Xb13, Xb15, Xb16, Xb17, Xb18, Xb20 y Xb21 pueden ser cada uno independientemente una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 12; en la que Xb1, Xb6, Xb14 pueden ser cada uno independientemente una sustitución de aminoácidos semiconservada en comparación con la SEQ ID NO: 12 (el VH de ratón);

en la que Xb3 puede ser V o K;
 en la que Xb10 puede ser V o G; y

en la que Xb19 puede ser T o R.

En este documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 38 (dominio variable de cadena pesada de 25E9 genérico (consenso 3)).

EIQLQQSGX_{b1}EX_{b2}X_{b3}X_{b4}PGX_{b5}SVX_{b6}X_{b7}SCKASGYTFTDYDMHWVX_{b8}QX_{b9}PX_{b10}
 30 X_{b11}GLEWX_{b12}GTIDPETGGTAYNQKFKGX_{b13}X_{b14}TX_{b15}TADX_{b16}SX_{b17}X_{b18}TAYMELSSLX_{b19}SEDX_{b20}AVYYCTSFY
 YTYSNYDVGFAWYWGQGLTVTSX_{b21} (SEQ ID NO: 38);

en la que al menos uno del aminoácido identificado por X (incluyendo Xb1 a Xb21) puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 12 (el VH de ratón) y;

en la que Xb1 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, V o A);

en la que Xb2 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o V);

en la que Xb3 puede ser V o K;

en la que Xb4 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, R o K);

en la que Xb5 puede ser A o S;

en la que Xb6 puede ser T o K;

en la que Xb7 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o V);

en la que Xb8 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, K o R);

en la que Xb9 puede ser T o A;

en la que Xb10 puede ser V o G;

en la que Xb11 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, H o Q);

en la que Xb12 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, I o M);

en la que Xb13 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, K o R);

en la que Xb14 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, A o V);

en la que Xb15 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o I);

en la que Xb16 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, R o K);

en la que Xb17 puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (por ejemplo, S o T);

en la que Xb18 puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (por ejemplo, T o S);

en la que Xb19 puede ser T o R;

en la que Xb20 puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (por ejemplo, S o T); y

en la que Xb21 puede ser A o S.

En este documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera expuesto en la SEQ ID NO: 39 (dominio variable de cadena ligera de 25D8 genérico (consenso 1)).

DIVMTQXXXSPVTVXGXXASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQ
 MSNLAGVPRDFXSGSGTDFTLXISRVEAEDVGVVYCAQNLELPYTFGGGKXKX
 60 (SEQ ID NO.:39);

en la que al menos uno del aminoácido identificado por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 22 (la VL de ratón). La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservadora o no conservadora.

5 En el presente documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera expuesto en la SEQ ID NO: 40 (dominio variable de cadena ligera de 25D8 genérico (consenso 2)).

DIVMTQX_{c1}X_{c2}X_{c3}SX_{c4}PVTX_{c5}GX_{c6}X_{c7}ASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQ
 10 SPQLLIYQMSNLASGVPDRFSX_{c8}SGSGTDFTLX_{c9}ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFG GG TKX_{c10}EIK (SEQ ID NO: 40);

en la que al menos uno de los aminoácidos identificados por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 22 (la VL de ratón) y en la que Xc1, Xc3, Xc9 y Xc10 pueden ser cada uno independientemente una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 22;

en la que Xc2, Xc7, Xc8 pueden ser cada uno independientemente una sustitución de aminoácidos semiconservadora en comparación con la SEQ ID NO: 22;

en la que Xc4 puede ser N o L;

en la que Xc5 puede ser L o P; y

en la que Xc6 puede ser T o E.

En el presente documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera expuesto en la SEQ ID NO: 41 (dominio variable de cadena ligera de 25D8 genérico (consenso 3)).

25 DIVMTQLVXczXcaSXcxPVTXcsGXceXc/ASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKP
 GQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSXcsSGSGTDFTLXcgISRVEAEDVGVYYCAQNLELP YTFGGGTXdoEIK (SEQ ID NO: 41);

en la que al menos uno de los aminoácidos identificados por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 22 (la VL de ratón) y en la que Xc1 puede ser A o T;

en la que Xc2 puede ser A o P;

en la que Xc3 puede ser F o L;

en la que Xc4 puede ser N o L;

en la que Xc5 puede ser L o P;

en la que Xc6 puede ser T o E;

en la que Xc7 puede ser S o P;

en la que Xc8 puede ser S o G;

en la que Xc9 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, R o K); y

en la que Xc10 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o V).

40 En el presente documento se describe un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada expuesto en la SEQ ID NO: 42 (dominio variable de cadena pesada de 25D8 genérico (consenso 1)).

QVQXQQXGAEXXKPGXSVKXSKASGYTFTSYWMHWVXQXPGQGLEWXGLI
 NPSNARTNYNEKFNTXXTXDKSXSTAYMXLSSLXSEDXAVYYCARGGDGDYFDYW
 GQGTXTVSS (SEQ ID NO.:42);

45 en la que al menos uno del aminoácido identificado por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 26 (el VH de ratón). La sustitución de aminoácidos puede ser, por ejemplo, conservadora o no conservadora.

En el presente documento se describe un anticuerpo, que tiene un dominio variable de cadena pesada expuesto en la SEQ ID NO: 43 (dominio variable de cadena pesada de 25D8 genérico (consenso 2)).

50 QVQX_{d1}QQX_{d2}GAEX_{d3}X_{d4}KPGX_{d5}SVKX_{d6}SCKASGYTFTSYWMHW_{d7}WX_{d8}PGQ
 GLEW_{d9}GLINPSNARTNYNEKFNTX_{d10}X_{d11}TX_{d12}TX_{d13}DKSX_{d14}STAYMX_{d15}LSSLX_{d16}SE
 DX_{d17}AVYYCARGGDGDYFDYWGGQTTX_{d18}TVSS (SEQ ID NO: 43);

55 en la que al menos uno del aminoácido identificado por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 26 (la VH de ratón) y; en la que Xd1, Xd3, Xd5, Xd6, Xd7, Xd9, Xd10, Xd12, Xd14, Xd15, Xd17, Xd18 pueden ser cada uno independientemente una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 26;

en la que Xd2, Xd11, Xd13, pueden ser cada uno independientemente una sustitución de aminoácidos semiconservadora en comparación con la SEQ ID NO: 26;

en la que Xd4 puede ser V o K;

en la que Xd8 puede ser R o A; y;

en la que Xd16 puede ser T o R.

En el presente documento se describe un anticuerpo, que tiene un dominio variable de cadena pesada expuesto en la SEQ ID NO: 44 (dominio variable de cadena pesada de 25D8 genérico (consenso 3)).

QVQX_{d1}QQX_{d2}GAEX_{d3}X_{d4}KPGX_{d5}SVKX_{d6}SCKASGYTFTSYWMHWVX_{d7}QX_{d8}PG
QGLEW_{d9}GLINPSNARTNYNEKFNTX_{d10}X_{d11}TX_{d12}TX_{d13}DKSX_{d14}STAYMX_{d15}LSSLX_{d16}S

- 5 EDX_{d17}AVYYCARGGDGDYFDYWGQGT_{d18}TVSS (SEQ ID NO: 44);
en la que al menos uno del aminoácido identificado por X puede ser una sustitución de aminoácidos en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 26 (la VH de ratón) y;
en la que Xd1 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, V o L);
en la que Xd2 puede ser P o S;
10 en la que Xd3 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o V);
en la que Xd4 puede ser V o K;
en la que Xd5 puede ser A o S;
en la que Xd6 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o V);
en la que Xd7 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, K o R);
15 en la que Xd8 puede ser R o A;
en la que Xd9 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, I o M);
en la que Xd10 puede ser un aminoácido básico (por ejemplo, K o R);
en la que Xd11 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, A o V);
en la que Xd12 puede ser un aminoácido hidrofóbico (por ejemplo, L o I);
20 en la que Xd13 puede ser un aminoácido hidrofóbico (V o A);
en la que Xd14 puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (por ejemplo, S o T);
en la que en la que Xd15 puede ser Q o E;
en la que Xd16 puede ser T o R.
en la que Xd17 puede ser un aminoácido hidrofílico neutro (por ejemplo, S o T); y
25 en la que Xd18 puede ser un aminoácido hidrofóbico (L o V).

El término "anticuerpo humanizado" abarca anticuerpo completamente humanizado (es decir, los marcos son 100% humanizados) y anticuerpo parcialmente humanizado (por ejemplo, al menos un dominio variable contiene uno o más aminoácidos de un anticuerpo humano, mientras que otros aminoácidos son aminoácidos de un anticuerpo parental no humano). Normalmente, un "anticuerpo humanizado" contiene CDR de un anticuerpo parental no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, primate no humano, etc.) y marcos que son idénticos a los de un anticuerpo humano natural o de un consenso de anticuerpo humano. En tal caso, esos "anticuerpos humanizados" se caracterizan como completamente humanizados. Un "anticuerpo humanizado" también puede contener una o más sustituciones de aminoácidos que no tienen correspondencia con las del anticuerpo humano o consenso de anticuerpo humano. Tales sustituciones incluyen, por ejemplo, retromutaciones (por ejemplo, reintroducción de aminoácidos no humanos) que pueden preservar las características del anticuerpo (por ejemplo, afinidad, especificidad, etc.). Tales sustituciones están usualmente en la región marco. Un "anticuerpo humanizado" opcionalmente también comprende al menos una porción de una región constante (Fc) que es típicamente la de un anticuerpo humano. Típicamente, la región constante de un "anticuerpo humanizado" es idéntica a la de un anticuerpo humano.

Por supuesto, cualquier anticuerpo, o porción de anticuerpo (regiones variables de cadena ligera o cadena pesada), que tenga una secuencia de aminoácidos idéntica a la reivindicada en este documento está incluida en la presente invención, independientemente de si se obtiene mediante tecnología de humanización, tecnología de hibridoma, tecnologías de ratones transgénicos, etc.

Debe entenderse en este documento que los aminoácidos marco de los anticuerpos descritos en este documento pueden ser de 80% a 100% (por ejemplo, 85 a 100%; 90 a 100%, 95 a 100%) idénticos a los de anticuerpos humanos naturales. Generalmente, cuando un aminoácido del marco no es idéntico a un aminoácido correspondiente de un anticuerpo natural, dicho aminoácido puede permanecer idéntico al aminoácido original (por ejemplo, un aminoácido de ratón).

Como se usa en el presente documento, el término "de uno a veinticinco (1 a 25)" incluye todos los valores e intervalos individuales, como por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 25; 1 a 25; 1 a 24, 1 a 23, 1 a 22, 1 a 21, 1 a 20, 1 a 19; 1 a 18; 1 a 17; 1 a 16; 1 a 15 y así sucesivamente; 2 a 25, 2 a 24, 2 a 23, 2 a 22, 2 a 21, 2 a 20; 2 a 19; 2 a 18; 2 a 17 y así sucesivamente; 3 a 25, 3 a 24, 3 a 23, 3 a 22, 3 a 21, 3 a 20; 3 a 19; 3 a 18 y así sucesivamente; 4 a 25, 4 a 24, 4 a 23, 4 a 22, 4 a 21, 4 a 20; 4 a 19; 4 a 18; 4 a 17; 4 a 16 y así sucesivamente; 5 a 25, 5 a 24, 5 a 23, 5 a 22, 5 a 21, 5 a 20; 5 a 19; 5 a 18; 5 a 17 y así sucesivamente, etc.

Del mismo modo, otros intervalos como, por ejemplo, "de uno a veintidós (1 a 22)" incluyen todos los valores e intervalos individuales, tales como por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 22; 1 a 22, 1 a 21, 1 a 20, 1 a 19, 1 a 18, 1 a 17, 1 a 16, 1 a 15; 1 a 14; 1 a 13; 1 a 12; 1 a 11; 1 a 10 y así sucesivamente; 2 a 22, 2 a 21, 2 a 20, 2 a 19, 2 a 18, 2 a 17, 2 a 16, 2 a 15; 2 a 14; 2 a 13; 2 a 12 y así sucesivamente; 3 a 22, 3 a 21, 3 a 20, 3 a 19, 3 a 18, 3 a 17, 3 a 16, 3 a 15; 3 a 14; 3 a 13 y así sucesivamente; 4 a 22, 4 a 21, 4 a 20, 4 a 19, 4 a 18, 4 a 17, 4 a 16, 4 a 15; 4 a 14; 4 a 13; 4 a 12; 4 a 11 y así sucesivamente; 5 a 22, 5 a 21, 5 a 20, 5 a 19, 5 a 18, 5 a 17, 5 a 16, 5 a 15; 5 a 14; 5 a 13; 5 a 12 y así sucesivamente, etc.

El número de sustituciones de aminoácidos que pueden realizarse en una región variable de cadena ligera derivada de la SEQ ID NO 6 puede ser, por ejemplo, de 1 a 11 sustituciones de aminoácidos.

5 El número de sustituciones de aminoácidos que pueden realizarse en una región variable de cadena pesada derivada de la SEQ ID NO: 12 puede ser, por ejemplo, de 1 a 21 sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, cuando se considera la SEQ ID NO: 12, puede ser útil tener al menos tres sustituciones de aminoácidos.

10 El número de sustituciones de aminoácidos que pueden realizarse en una región variable de cadena ligera derivada de la SEQ ID NO: 22 puede ser, por ejemplo, de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos.

El número de sustituciones de aminoácidos que pueden realizarse en una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 26 puede ser, por ejemplo, de 1 a 18 sustituciones de aminoácidos.

15 Las sustituciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, en la región variable de la cadena ligera. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, en la región variable de la cadena pesada.

20 Por lo tanto, un anticuerpo puede tener una región variable de cadena ligera que tiene hasta veintidós sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 22 y puede tener una región variable de cadena pesada que tiene hasta veinticinco sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 26. Debe entenderse en este documento que cuando el anticuerpo tiene dos regiones variables de cadena ligera y dos regiones variables de cadena pesada, cada una de las regiones variables de cadena ligera puede tener independientemente hasta veinte sustituciones de aminoácidos y cada una de las regiones variables de cadena pesada puede tener hasta veinte sustituciones de aminoácidos.

25 Como se describe en el presente documento, las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras o no conservadoras. En un ejemplo de realización, las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras.

30 Debe entenderse en el presente documento que el anticuerpo descrito en el presente documento puede, si se desea, tener una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada que muestre una eliminación en comparación con la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 22 y/o la SEQ ID NO: 26. Dicha eliminación se puede encontrar, por ejemplo, en un extremo terminal amino o carboxilo de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada.

35 En el presente documento se describe un anticuerpo que tiene una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10.

40 Como se usa en este documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 33" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, o al menos 112 aminoácidos consecutivos".

45 El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 33" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 33 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 33, tal como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 108, 5 a 109, 13 a 103, 14 a 111 de la SEQ ID NO: 33 y así sucesivamente.

50 Como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 34" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, o al menos 112 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 34" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO:34 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 34, como por ejemplo una secuencia que comprende los aminoácidos 7 a 109, 12 a 104, 22 a 112, 18 a 112 de la SEQ ID NO:34 y así sucesivamente.

55 Los términos "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 35", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 8" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 10" tienen significados similares.

60 El anticuerpo tal como se describe en el presente documento puede tener, por ejemplo, una región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 8 o en la SEQ ID NO: 10.

65 El anticuerpo como se describe en este documento incluye (o incluye además), por ejemplo, una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 37, 38, 14, 16, 18 o 20.

Como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 36" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, o al menos 123 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 36" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 36 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 36, tal como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 1 a 106, 2 a 112, 11 a 113, 7 a 102 de la SEQ ID NO: 36 y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 37" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 o al menos 123 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 37" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 37 y, especialmente, aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 37, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 109, 8 a 113, 1 a 102, 2 a 105 de la SEQ ID NO: 37 y así sucesivamente.

Los términos "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 38", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 14", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 16", "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 18" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 20" tienen significados similares. El anticuerpo puede tener, por ejemplo, una región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, 16, 18 o 20.

El anticuerpo tal como se describe en el presente documento puede comprender, por ejemplo,

a) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20;

b) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 34 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20;

c) una región variable de cadena ligera que puede comprender aminoácidos al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 35 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20;

d) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20; o

e) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20.

La región variable de la cadena ligera puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 8 o 10 y la región variable de la cadena pesada puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de las SEQ ID NO: 14, 16, 18 o 20. La región variable de la cadena ligera puede ser la expuesta en la SEQ ID NO: 8 o 10, y la región variable de la cadena pesada puede ser la expuesta en la SEQ ID NO: 14, 16, 18 o 20.

Más particularmente, se contemplan los anticuerpos que comprenden el conjunto de regiones variables de la cadena ligera en la SEQ ID NO: 8 y la región variable de la cadena pesada expuestas en la SEQ ID NO: 14.

Otros anticuerpos descritos en este documento son aquellos que pueden comprender una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO 39, 40, 41 o 24.

Como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 39" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110 111 o al menos 112, aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO:39" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 39 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 39, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 102, 11 a 106, 1 a 106, 3 a 95, 5 a 95 de la SEQ ID NO: 39 y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 40" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107,

108, 109, 110, 111 o al menos 112, aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 40" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 40 y, especialmente, las secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 40, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 9 a 106, 10 a 101, 1 a 98, 3 a 99, 7 a 107 de la SEQ ID NO: 40 y así sucesivamente.

Los términos "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 41" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 24" tienen significados similares.

El anticuerpo descrito en el presente documento puede tener, por ejemplo, una región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 24.

El anticuerpo descrito en este documento incluye (o incluye además), por ejemplo, una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 42, 43, 44 o 26. Tal como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 42" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 o al menos 118 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 42" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 42 y, especialmente, aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 42, tal como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 111, 1 a 106, 2 a 104, 5 a 106, 10 a 107 de la SEQ ID NO: 42 y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 43" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 o al menos 118 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 43" abarca cualquier secuencia posible de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrados en la SEQ ID NO: 43 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de la SEQ ID NO: 43, tal como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 3 a 107, 1 a 115, 1 a 110, 22 a 116, 20 a 115 de la SEQ ID NO: 43 y así sucesivamente.

Los términos "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 44" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 26" tienen un significado similar.

El anticuerpo tal como se describe en el presente documento puede tener, por ejemplo, una región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 26.

Como se describe en el presente documento, el anticuerpo puede comprender, por ejemplo,

- a) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 26;
- b) una región variable de la cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 40 y una región variable de la cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 26;
- c) una región variable de cadena ligera que puede comprender aminoácidos al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 41 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 26 o;
- d) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 24 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 26.

La región variable de la cadena ligera puede tener al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 24 y la región variable de la cadena pesada puede tener al menos 90 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 26.

La región variable de la cadena ligera puede ser como se expone en la SEQ ID NO: 24 y la región variable de la cadena pesada puede ser como se expone en la SEQ ID NO: 26.

En este documento también se describe un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- a. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 13;
- b. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15;
- c. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 17;

- d. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 19;
- e. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 29;
- 5 f. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 59;
- g. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 60;
- 10 h. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 61;
- i. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 13;
- j. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15;
- 15 k. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 17;
- l. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 19;
- 20 m. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 29;
- n. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 59;
- o. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 60;
- 25 p. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 61;
- q. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 23 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 27;
- 30 r. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 23 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 46.

En este documento también se describe un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- 35 a. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 13;
- b. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15;
- c. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 17;
- 40 d. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 19;
- e. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 29;
- 45 f. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 59;
- g. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 60;
- h. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 61;
- 50 i. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 11;
- j. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO ... y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 30;
- 55 k. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 11; y
- l. un anticuerpo que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 30.

60 El anticuerpo descrito en el presente documento puede tener una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada como se describió anteriormente y puede comprender además aminoácidos de una región constante, tal como, por ejemplo, aminoácidos de una región constante de un anticuerpo humano.

El anticuerpo de la presente invención comprende una región constante de IgG1 humana.

Se contemplan particularmente los anticuerpos anti-Siglec-15 de los subtipos IgG1, que tienen, por ejemplo, un aumento de la actividad de al menos 10 veces en comparación con los correspondientes subtipos de IgG2 *u otros subtipos).

- 5 Un aumento en la potencia del anticuerpo anti-Siglec-15 basado en IgG1 de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100 veces o más o un aumento en su afinidad de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100 veces o más pueden ser particularmente útiles.

10 El aumento de potencia o afinidad se puede medir por la capacidad del anticuerpo anti-Siglec-15 basado en IgG1 para inhibir la diferenciación de osteoclastos o la actividad de osteoclastos en comparación con un subtipo de anticuerpo diferente que tiene CDR idénticas o sustancialmente idénticas o regiones variables. En algunas circunstancias, puede ser posible considerar el uso de una concentración de anticuerpo IgG1 tan baja como 10 ng/ml o 100ng/ml para intentar inhibir la diferenciación de osteoclastos y/o la resorción ósea *in vitro*. Se puede entender en el presente documento que una dosis más baja de anticuerpos anti-Siglec-15 basados en IgG1 puede lograr un efecto terapéutico deseado cuando se compara, por ejemplo, con un anti-Siglec-15 basado en IgG2 correspondiente. Los anticuerpos particularmente contemplados incluyen aquellos que tienen una región constante de la cadena ligera kappa y una región constante de la cadena pesada IgG1.

20 Los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos que tienen la secuencia de aminoácidos según se reivindica. Se contemplan particularmente los anticuerpos humanos y humanizados que tienen las secuencias de aminoácidos reivindicadas.

25 Debe entenderse en este documento que las secuencias de anticuerpos formadas por a) una región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 6 y una región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 12 o b) una región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 22 y una región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 26 se consideran de origen de ratón (es decir, un anticuerpo no humano).

30 Como se indica en el presente documento, la humanización de un anticuerpo no humano se puede realizar, por ejemplo, mediante la sustitución de aminoácidos del marco por los aminoácidos correspondientes de un anticuerpo humano natural. Las sustituciones se hacen generalmente de una manera que no afecta negativamente a la unión del antígeno.

35 Ejemplos

Con base en los ensayos de unión a Siglec-15 recombinante y la evaluación de su capacidad para inhibir la diferenciación y la actividad de los osteoclastos humanos, se seleccionaron los anticuerpos candidatos 25D8 y 25E9 para la humanización. Este informe experimental describe el procedimiento de humanización *in silico* y las versiones humanizadas resultantes de los anticuerpos.

40 **Ejemplo 1.** Modelado tridimensional de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales 25D8 y 25E9 de ratón

45 Esta tarea se realizó mediante un modelo de homología. Las estructuras de la plantilla más similares a las secuencias variables de 25D8 (SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 26) y 25E9 (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 12) se identificaron mediante una búsqueda por blast contra PDB. Para construir un modelo inicial de la región variable de 25D8 de ratón, se utilizaron las siguientes estructuras de plantilla (códigos PDB): 3CFC para la cadena ligera y 1NGQ para la cadena pesada. Para construir un modelo inicial de la región variable de 25E9 de ratón, se utilizaron las siguientes estructuras de plantilla: 1AE6 para la cadena ligera y 1NMC para la cadena pesada. Las mutaciones fueron operadas en estas estructuras de plantilla de acuerdo con las secuencias murinas 25D8 y 25E9: 3 mutaciones en la cadena ligera de 3CFC (todas en las CDR), 17 mutaciones en 1 cadena pesada de GQ (3 en el marco, 14 en las CDR), 7 mutaciones en la cadena ligera de 1AE6 (4 en el marco, 3 en las CDR) y 34 mutaciones en 1 cadena pesada de NMC (17 en el marco, 17 en las CDR). Los bucles de CDR no parecieron requerir ningún ajuste en la longitud, excepto el bucle CDR-H3 en cada anticuerpo (la eliminación de 2 residuos se realizó de 1 GQ a 25D8, y la inserción de 1 residuo de 1 NMC a 25E9). Las estructuras mutadas correspondientes a las cadenas pesada y ligera de los dominios variables murinos 25D8 y 25E9 se ensamblaron virtualmente en estructuras de anticuerpos de dos cadenas mediante la superposición de las cadenas pesada y ligera de las estructuras de plantilla respectivas. Las estructuras resultantes de los dominios variables 25D8 y 25E9 ensamblados se refinaron primero mediante minimización de energía con el campo de fuerza de AMBER y una liberación gradual de restricciones, que van desde los bucles de CDR que se relajaron primero, hasta los átomos pesados de la cadena principal de la región marco que se relajaron totalmente solo en la última etapa. El bucle CDR-H3 en cada estructura de dominio variable de anticuerpo se refinó luego por muestreo conformacional de minimización de Monte-Carlo (MCM), en el que se muestrearon ángulos diedros en la región CDR-H3 en cada ciclo de MCM seguido de minimización de energía de una región predefinida que se extiende 10 Å alrededor de la conformación inicial del bucle CDR-H3.

65

Las representaciones de las regiones variables modeladas de los anticuerpos 25D8 y 25E9 de ratón se presentan en la Figura 1A y 1B, respectivamente. Modelos tridimensionales de homología de la región variable de los anticuerpos 25D8 de ratón (Figura 1A) y 25E9 de ratón (Figura 1B). Las CDR están marcadas (L1, L2, L3 en la cadena ligera y H1, H2, H3 en la cadena pesada). Los residuos del marco de ratón reemplazados por los residuos del marco humano se indican como modelos de esfera azul. Los residuos de ratón retenidos en la cadena pesada de 25E9 están representados por modelos de esfera roja y etiquetados.

Las estructuras de las secuencias variables humanas o humanizadas más similares a cada una de las secuencias variables de 25D8 y 25E9 también se identificaron a partir de PDB, y luego se superponen a las estructuras modeladas de los dominios variables de 25D8 y 25E9 murinos. Esto ayudó al modelado de mutaciones de cadena lateral en la región marco para construir la estructura tridimensional humanizada a partir de las estructuras tridimensionales murinas modeladas.

Ejemplo 2. Caracterización de las secuencias de aminoácidos de 25D8 y 25E9 de ratón y la estructura modelada

Esta etapa se llevó a cabo para estimar el índice de humanidad, el índice de propensión al contacto con el antígeno, para delinear las CDR, los residuos canónicos, el empaquetamiento entre cadenas (residuos de la interfaz VHA/L), el empaquetamiento de la región variable/constante (los residuos de la interfaz VH/CH y VL/CL), residuos inusuales del marco, sitios potenciales de glicosilación de N y O, residuos enterrados, residuos de la zona de Vernier y proximidad a las CDR. Los recursos disponibles en Internet y el software local se utilizaron para evaluar estas propiedades.

Ejemplo 3. Selección de los mejores marcos de cadena ligera y cadena pesada humanas para las CDR de ratón

Esto se realizó mediante una comparación de homología de secuencia estándar frente a una copia local de bases de datos de línea germinal humana (VBASE), frente a otras bibliotecas de secuencia (Genbank y SwissProt), así como también al conjunto de secuencias de consenso de marco humanas. Se realizaron búsquedas en BLAST para recuperar coincidencias de secuencia con la homología más alta solo en la región marco (excluyendo así las CDR) al tiempo que coinciden con la longitud de los bucles de CDR. Los marcos humanos identificados para las cadenas pesada y ligera corresponden a las clases k2 y hi, respectivamente, para ambos anticuerpos 25D8 y 25E9. Se retuvieron varias secuencias marco humanas muy similares para evaluar la variabilidad de aminoácidos en las posiciones candidatas para la mutación, así como para proporcionar un conjunto de secuencias marco adecuadas como respaldo en caso de pérdida de afinidad tras la humanización.

Estas secuencias marco humanas homólogas se alinean con las secuencias 25D8 y 25E9 murinas en las Figuras 2 y 3, respectivamente. La numeración de Kabat y las puntuaciones de propensión al contacto con el antígeno se muestran en la parte superior. Las CDR están resaltadas en gris. Los residuos candidatos para retromutaciones se resaltan debajo de la alineación de la secuencia de acuerdo con la proximidad a las CDR, la exposición de la superficie y el contacto con el dominio variable de emparejamiento. Las posiciones candidatas primarias para retromutaciones se indican mediante flechas.

Ejemplo 4. Identificación de residuos marco de ratón que pueden influir en la conformación y la unión al antígeno

Esta es una etapa importante que marca los residuos de aminoácidos que deben ser mutados a las secuencias humanas correspondientes con especial cuidado. Estos residuos representan candidatos primarios para retromutaciones en las secuencias de ratón en caso de pérdida por afinidad. Es la etapa más difícil e impredecible de la humanización por diseño, particularmente en ausencia de una estructura experimental del complejo antígeno-anticuerpo. Se basa en la identificación de residuos en una o más de las siguientes categorías: canónica, CDR-H3, zona de Vernier, inusual, proximal a CDR (dentro de 5 Å), empaquetamiento entre cadenas y residuos del sitio de glicosilación. Dichos residuos pueden afectar el sitio de unión al antígeno y la afinidad directa o indirectamente. El índice de propensión al contacto con el antígeno, así como la aparición de aminoácidos en las bases de datos de la línea germinal humana en cada posición también son extremadamente importantes para decidir si un cierto residuo puede mutarse de forma segura de la secuencia de ratón a la secuencia humana. Las secuencias humanizadas propuestas de las secuencias variables ligera y pesada de 25D8 y 25E9 se muestran en las Figuras 2 y 3, respectivamente. El número de mutaciones en el marco entre cada secuencia humanizada y su secuencia de ratón donante y varias secuencias alineadas humanas receptoras candidatas también se enumeran (dado como porcentaje del marco entre paréntesis). Los residuos mutados y los residuos candidatos para retromutaciones también se indican en las Figuras 1, 2 y 3. Como puede verse, las cadenas ligeras de los anticuerpos 25D8 y 25E9 parecen requerir 9 y 11 mutaciones en sus respectivos marcos humanizados propuestos, respectivamente. Esto representa un intento de humanización del marco del 100% para las cadenas ligeras. La cadena pesada de cada anticuerpo parece requerir sustancialmente más mutaciones que sus cadenas ligeras para la humanización, 18 en el caso de 25D8 y 17 en el caso de 25E9. Además, las secuencias humanizadas para las cadenas pesadas no corresponden completamente (100%) a las secuencias marco humanas. Particularmente en el caso de la cadena pesada de 25E9, el nivel más alto de humanización del marco propuesto es del 94% en un primer intento, lo que se traduce en 5 residuos que difieren en la secuencia humanizada de la secuencia del marco humano más cercano. La decisión de retener 4 de estos residuos de la secuencia de ratón 25E9 se basó en cuidadosos análisis estructurales y comparativos de secuencia que indicaron una alta probabilidad de alterar la afinidad de unión al antígeno si se van a

introducir mutaciones en estas posiciones: GluH1, IleH2, ThrH93 y SerH94 debido a la proximidad a las CDR de unión a antígeno (véase la Figura 1b). Se debe tener en cuenta que Glu es un residuo común que se encuentra en la posición H1 en las secuencias marco humanas (véase la Figura 3). Un quinto residuo que se diferencia en la secuencia humanizada del marco humano más cercano es HisH43 en la secuencia de ratón, que se mutó a GlnH43 en la secuencia humanizada (Gln es común en esta posición, mientras que His es raro). En el caso de la humanización del marco de la cadena pesada variable de 25D8, que alcanzó el 99%, es decir, una diferencia de residuos en el marco de la secuencia humanizada propuesta con respecto a la secuencia del marco humano más cercana: GluH81 en las secuencias humanizadas reemplazó a GlnH81 de la secuencia de ratón en lugar de AspH81 que aparece en el marco humano más cercano. La decisión de mutar a Glu en lugar de Asp en la posición H81 se basó en la ocurrencia relativa de estas dos posibles sustituciones en marcos humanos (véase la Figura 2). En general, se puede concluir que la humanización del anticuerpo 25D8 es más fácil que la del anticuerpo 25E9.

Ejemplo 5. Análisis estructural adicional

Antes de enviar la secuencia humanizada para la expresión recombinante, el análisis estructural adicional incluía la selección del péptido señal, la selección del isotipo y el análisis de la compatibilidad estructural en las uniones de región variable/constante. Además, un análisis comparativo del empaquetamiento entre cadenas y el empaquetamiento de las regiones variable/constante entre los anticuerpos de ratón y humanizados indicó que en el caso de las humanizaciones de 25D8 y 25E9 puede ser posible generar anticuerpos híbridos que combinen las cadenas humanizada y quimérica (región variable de ratón), es decir, ratón/ratón (MM), ratón/humanizada (M/H), humanizada/ratón (H/M) y humanizada/humanizada (H/H) como emparejamiento de cadena ligera/cadena pesada. En las Figuras 4A y 4B, se muestran las secuencias humanizadas y quiméricas ensambladas para los anticuerpos IgG2 de longitud completa 25D8 y 25E9, respectivamente. En las Figuras 12A y 12B, se muestran las secuencias humanizadas y quiméricas ensambladas para los anticuerpos IgG1 de longitud completa 25D8 y 25E9, respectivamente.

Se pueden generar otros ejemplos de realizaciones de anticuerpos, por ejemplo, mezclando cada una de las cadenas ligeras descritas en el presente documento con cada una de las variantes de cadena pesada descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos pueden generarse por la asociación de una cadena ligera y una cadena pesada que comprenden respectivamente el dominio variable de la variante 2 humanizada de la cadena ligera de 25E9 (SEQ ID NO: 10) y las variantes 1, 2, 3 o 4 del dominio variable humanizado de la cadena pesada de 25E9 (SEQ ID NO: 14, 16, 18 o 20). Se contemplan particularmente los anticuerpos generados por la asociación de una cadena ligera y una cadena pesada que comprenden respectivamente, el dominio variable de la variante 1 humanizada de la cadena ligera de 25E9 (SEQ ID NO: 8) y las variantes 1, 2 3 o 4 del dominio variable humanizado de la cadena pesada de 25E9 (SEQ ID NO: 14, 16, 18 o 20). Anticuerpos 25E9 humanizados que comprenden el dominio variable de la variante 1 humanizada de la cadena ligera (SEQ ID NO: 8) y la variante 1 del dominio variable humanizado de la cadena pesada (SEQ ID NO: 14) (también conocida como la variante IgG2 L1H1 (SEQ ID NO: 7 y 29) o la variante IgG1 L1H1 (SEQ ID NO: 7 y 13) se han seleccionado para una experimentación adicional. Sin embargo, según los experimentos aquí descritos, parece que los anticuerpos que tienen una región constante de la cadena ligera kappa y una región constante de la cadena pesada de IgG1 tienen características interesantes (por ejemplo, la variante IgG1 L1H1 (SEQ ID NO: 7 y 13)).

Los anticuerpos producidos por la asociación de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 7 con cualquiera de las cadenas pesadas expuestas en las SEQ ID NOS: 13, 15, 17, 19, 29, 59, 60 o 61 o por la asociación de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 9 con cualquiera de las cadenas pesadas establecidas en las SEQ ID NOS: 13, 15, 17, 19, 29, 59, 60 o 61 están contemplados.

Ejemplo 6. Análisis de los parámetros de unión de los anticuerpos Siglec-15 humanizados

Se produjeron pequeños lotes de anticuerpos de ratón y se seleccionaron IgG2 25D8 humanizado o quimérico y 25E9 humanizado (las variantes IgG2 L1H1, IgG1 L1H1, IgG1 L1H2, IgG L1H3 y IgG1 L1H1) por transfección transitoria y se purificaron para permitir realizar algunos análisis comparativos. Se usó un procedimiento de resonancia de plasmón de superficie (SPR) para medir la unión directa de Siglec-15 recombinante con los diferentes anticuerpos. Al igual que con los procedimientos de ELISA, el Siglec-15 que se usó en los experimentos SPR se expresó como una proteína de fusión Fc-Siglec-15 en las células 293-6E. Cabe señalar que, como conjugado de Fc, la proteína puede expresarse como dímero en virtud de la interacción homodimérica en la región Fc. Esta ocurrencia podría producir efectos de avididad durante la unión que no permitieron una determinación directa de las constantes de afinidad. Además, la presencia de la región Fc tanto en los anticuerpos como en la proteína Siglec-15 no permite determinaciones de afinidad directas. Por lo tanto, los resultados de unión de cada muestra de anticuerpo se presentan solo en relación una con otra.

Para llevar a cabo el estudio, se utilizaron directamente las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera de IgG2 25D8 quimérica (regiones variables de ratón), IgG2 25E9 quimérica, IgG2 25D8 humanizada o la variante IgG2 L1H1 de 25E9 humanizada. Para comparación, también se probaron preparaciones purificadas de anticuerpos completos de ratón. En el caso de los lotes de anticuerpos purificados, se aplicó cromatografía de exclusión por tamaño a todas las muestras de proteínas para reducir la proporción de agregados en las preparaciones. Para SPR,

el Fc-Siglec-15 se inmovilizó en el chip del sensor y se inyectaron las diluciones de anticuerpos (fluyeron) sobre los chips. Los barridos representativos para los anticuerpos 25D8 y 25E9 se muestran en las Figuras 5A y 5B, respectivamente.

5 Para el anticuerpo 25D8, las exploraciones fueron muy similares entre las versiones de ratón, quimérica y humanizada del anticuerpo. Esto mostró que los parámetros cinéticos no se alteraron significativamente durante la humanización de este anticuerpo. Aunque existen ligeras diferencias entre los cromatogramas, esto era de esperar dado que la comparación se realizó entre anticuerpos purificados y sobrenadantes celulares.

10 En el caso del anticuerpo 25E9, los cromatogramas para los anticuerpos quiméricos y de ratón fueron muy similares. Para la variante humanizada de IgG2 L1H1 25E9, las tasas de activación y desactivación parecían ser ligeramente diferentes en comparación con las otras versiones. Esto fue probablemente debido a la interferencia de los sobrenadantes celulares. A pesar de esta diferencia, se esperaba que la constante de afinidad real de la variante IgG2 L1H1 25E9 humanizada fuera muy similar a la del anticuerpo de ratón.

15 Se probó la capacidad de los anticuerpos humanizados para interactuar con Siglec-15 humano expresado en la superficie de las células cultivadas. Las células 293-6E humanas se cultivaron hasta una densidad celular de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/ml y se transfectaron con un plásmido de expresión que codifica todo el ADNc de Siglec-15 humano. Veinticuatro horas después, las células se recogieron, se contaron y se incubaron 1×10^5 células con concentraciones crecientes de la variante IgG1 humanizada de 25E9 durante 1 hora a 4°C. Después de una etapa de lavado con PBS frío, se detectó 25E9 unido con una IgG de cadena ligera kappa antihumana conjugada con FITC. Las células marcadas de manera fluorescente se inyectaron en un citómetro de flujo para medir la señal de fluorescencia en la superficie de las células intactas. Como se muestra en la Figura 8, la variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada se une a las células que expresan Siglec-15 humano de una manera dependiente de la concentración. La K_D promedio estaba en el intervalo nanomolar bajo. Además, los parámetros de unión fueron muy similares en presencia de la variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada producida en células CHO o células 293. Como control, las células transfectadas incubadas con PBS, una IgG de control o las células 293 no transfectadas no dieron como resultado ninguna señal de fluorescencia que indicara la especificidad de la interacción entre Siglec-15 y la variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada. Se obtuvieron resultados similares con otras variantes del anticuerpo IgG1 humanizado 25E9 (la IgG1 L1H2, la IgG1 L1H3, la IgG1 L1H4 y la IgG2 L1H1) o con el anticuerpo IgG2 25D8 humanizado.

Ejemplo 7. Ensayos de anticuerpos

35 *Cultivo de células*

Para inducir la diferenciación de osteoclastos, se rasparon y se resuspendieron en PBS las células RAW264.7 de ratón (ATCC, Manassas, VA) cultivadas en DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10% (Gibco) y piruvato de sodio 1 mM. Las células se colocaron en placas a razón de 2×10^4 células/cm² en medio que contenía 100 ng/ml de RANKL de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se permitió que las células se diferenciaron durante 3 días (para microscopía de inmunofluorescencia) o 4 días (para todos los demás experimentos). Los precursores de osteoclastos humanos (células mononucleares de sangre periférica CD14+ (PBMC)) se aislaron a partir de PBMC humanas normales (AHCCells, Emeryville, CA) utilizando microperlas CD14 y columnas MS (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se colocaron en placas a razón de $3,1 \times 10^5$ células/cm² en Alpha-MEM (Gibco) que contenía suero de ternera fetal al 10% (HyClone), piruvato sódico 1 mM (HyClone), 25 ng/ml de MCSF humano y 30 ng/ml de RANKL humano (R&D Systems). Se permitió que las células se diferenciaron durante 7 días, con la mitad del medio reemplazado en el día 4.

50 *Estimulación celular*

Para la estimulación celular con anticuerpos individuales, el medio de diferenciación se reemplazó con medio de crecimiento fresco (sin RANKL) que contenía las concentraciones de anticuerpos indicadas antes de lisar las células en varios momentos. Para las estimulaciones con anticuerpos primarios y secundarios (entrecruzamiento), se reemplazó el medio de diferenciación con medio de crecimiento frío que contenía el anticuerpo primario a razón de 10 µg/ml, y las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C. El medio se reemplazó luego con medios de crecimiento cálidos que contenían anticuerpo policlonal anti-IgG humano (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) y las células se incubaron durante los tiempos indicados a 37°C antes de la lisis.

60 *Tinción con TRAP de osteoclastos y ensayos funcionales in vitro*

Para probar el efecto de los anticuerpos en la diferenciación y función de los osteoclastos, se indujo a las células a diferenciarse, como se describió anteriormente, en medio que contiene las concentraciones indicadas de anticuerpos. Los osteoclastos se visualizaron después de cuatro días en cultivo mediante tinción con TRAP: brevemente, las células se fijaron en formaldehído al 3,7%, se permeabilizaron con Triton X-100/PBS al 0,2% y se incubaron en tampón de tinción con TRAP (acetato de sodio 100 mM, pH 5,2, tartrato de sodio 50 mM, Naphthol ASMX al 0,01% y Fast Red Violet al 0,06%) durante aproximadamente 30 minutos a 37°C. La enzima de TRAP

genera un producto de reacción rojo en los osteoclastos. Para probar la actividad de resorción de los osteoclastos, las células se sembraron en pocillos recubiertos con un sustrato de fosfato de calcio (Osteologic, BD Biosciences o OsteoAssay, Corning) y se indujeron a diferenciarse como se indicó anteriormente. Después de 7 días, los pocillos se trataron con blanqueador para eliminar las células y se observaron áreas de distribución de sustratos mediante microscopía óptica. Los anticuerpos que pueden bloquear la actividad de Siglec-15 (en osteoclastos o en células precursoras de osteoclastos) pueden mostrar, por ejemplo, menos células multinucleadas positivas para TRAP o pueden dar como resultado una morfología alterada de las células multinucleadas positivas para TRAP. Esto se ilustra en la Figura 9. Como se muestra en los paneles superiores, los osteoclastos humanos expuestos a 1 µg/ml del anticuerpo 25E9 humanizado (variante de la IgG1 L1H1) (panel superior derecho) no pudieron formar correctamente osteoclastos multinucleados maduros. Por el contrario, los osteoclastos humanos tratados con una cantidad igual de un anticuerpo de control normalmente diferenciado (panel medio superior). Como los osteoclastos digieren activamente el sustrato mineralizado, los anticuerpos que pueden bloquear la actividad de Siglec-15 (en osteoclastos o en células precursoras de osteoclastos) pueden mostrar, por ejemplo, menos áreas donde el sustrato de calcio ha sido digerido (área desnuda) en comparación con un control (por ejemplo, anticuerpos que no se unen a Siglec-15, ausencia de anticuerpos, etc.). Cuando los osteoclastos humanos se diferenciaron en un sustrato de fosfato de calcio (véase la Figura 9), que actúa como una superficie similar a la de los huesos, las células tratadas con el anticuerpo de control (panel inferior central) generaron grandes áreas de fosfato de calcio desnudo, lo que indica que los osteoclastos exhibieron actividad de resorción. Por el contrario, las células tratadas con 1 µg/ml de 25E9 (la variante IgG1 L1H1) (panel inferior derecho) no pudieron reabsorber el sustrato, que era comparable a las células precursoras no diferenciadas (panel inferior izquierdo).

La capacidad del anticuerpo 25D8 para inhibir los osteoclastos también se conservó después de la humanización, aunque su potencia siempre se mantuvo más baja que la de los anticuerpos 25E9 (ya sean 25E9 humanizados o quiméricos).

Otra técnica involucra C de PB CD14+ que se diferencian en osteoclastos y se colocan en placas de cortes de hueso cortical bovino (la diferenciación se puede hacer antes de sembrar en las placas, después de sembrar en las placas o después de sembrar en las placas). Se agrega el anti-Siglec-15 y se observan los hoyos de resorción generados en la superficie del corte óseo mediante microscopía de luz reflejada. Los anticuerpos que pueden bloquear la actividad de Siglec-15 (en osteoclastos o en células precursoras de osteoclastos) pueden resultar, por ejemplo, en menos o más pequeños hoyos de resorción.

Nuestros resultados indican que los anticuerpos humanizados anti-Siglec-15 son capaces de inhibir la diferenciación de osteoclastos y/o la resorción ósea.

Ensayo de internalización

Para biotilar proteínas de la superficie celular, los osteoclastos diferenciados derivados de RAW264.7 se enjuagaron dos veces con PBS frío que contenía CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 1 mM (PBS/Ca/Mg, HyClone) y se incubaron con el reactivo de biotilación sulfo-NHS-SS-biotina (Pierce), diluido hasta 1 mg/ml en PBS/Ca/Mg durante 1 h a 4°C. La reacción se detuvo inactivando el reactivo de biotilación sin reaccionar con glicina (100 mM en PBS/Ca/Mg). Para inducir la internalización de Siglec-15, las células se trataron con un anticuerpo anti-Siglec-15 o una IgG humana de control sola o en combinación con un anticuerpo de entrecruzamiento secundario, como se describe en "Cell stimulations", más arriba. Después de los tratamientos con anticuerpos, las células se enjuagaron dos veces con tampón NT frío (Tris/HCl 20 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y BSA al 0,2%) y se incubaron 2 x 25 minutos con sulfonato de sodio-2-mercaptoetano (MesNa), preparado a 25 mM en tampón NT frío, para reducir el enlace disulfuro de la sulfo-NHS-SS-biotina y eliminar así cualquier biotina restante en la superficie celular. Para medir el nivel máximo posible de biotilación de Siglec-15, este tratamiento con MesNa se omitió para un control (estas células de control se incubaron 2 x 25 min con el tampón NT solo). El MesNa restante se inactivó luego con yodoacetamida, se diluyó a 5 mg/ml en PBS/Ca/Mg, durante 15 min.

Para evaluar la cantidad de Siglec-15 biotilado que se había internalizado por los osteoclastos, las células se lisaron en mRIPA. Las proteínas biotiladas se recogieron mediante extracción con estreptavidina: se incubaron 250 g de lisado durante la noche con 50 µl de perlas de estreptavidina Dynal MyOne (Invitrogen), rotando a 4°C. Después de un lavado exhaustivo, se detectó Siglec-15 en el material precipitado por transferencia Western.

Siglec-15 se internaliza y se degrada después de la ligadura del anticuerpo

La capacidad para mediar la endocitosis de ligandos y anticuerpos unidos se ha demostrado para algunos miembros de la familia Siglec; de hecho, la captación celular de anticuerpos terapéuticos es un aspecto crítico del mecanismo de acción de los conjugados anticuerpo-fármaco que se dirigen a los Siglec CD22 y CD33 (O'Reilly y Paulson, 2009). Curiosamente, Siglec-15 también contiene una secuencia Y_{xx}φ en su dominio citoplasmático (esta tirosina, Y309, también es parte de un motivo ITIM putativo); los motivos Y_{xx}f pueden interactuar con el adaptador de clatrina AP-2 para regular la internalización del receptor (Angata et al., 2007; Bonifacino y Traub, 2003). Por lo tanto, se investigó el efecto de la ligadura de anticuerpos en la endocitosis de Siglec-15 en osteoclastos.

Primero probamos si un anticuerpo Siglec-15, ya sea solo o en combinación con un anticuerpo de entrecruzamiento secundario, podría inducir la internalización de Siglec-15, marcado con biotina, de la superficie de los osteoclastos derivados de RAW264.7. Después de la estimulación con anticuerpos, cualquier biotina restante de la superficie celular se liberó mediante tratamiento con un agente reductor. Luego se lisaron e internalizaron las células, y las proteínas biotiniladas se recolectaron con perlas de estreptavidina. Se detectó Siglec-15 en el material precipitado mediante transferencia Western. Curiosamente, se encontró que el tratamiento con el anticuerpo Siglec-15 solo indujo una internalización sustancial en comparación con una IgG humana de control (Figura 10A, comparar los carriles 7 y 8), mientras que la adición de un anticuerpo secundario para inducir la agrupación de receptores tuvo menos efecto que el único anticuerpo (Figura 10A, carril 5).

Se procedió a caracterizar la endocitosis inducida por anticuerpos de Siglec-15 mediante microscopía de inmunofluorescencia. Los osteoclastos derivados de RAW264.7, que crecían en cubreobjetos de vidrio, se "cargaron en frío" con anti-Siglec-15 diluido en medio de crecimiento normal a 4°C, condiciones que deberían permitir la unión del anticuerpo pero no la endocitosis. Las células se fijaron inmediatamente después o se incubaron en medio caliente sin anticuerpos durante diferentes momentos antes de la fijación. Como se esperaba, con base en la distribución de Siglec-15 en osteoclastos fijos y permeabilizados, en osteoclastos intactos, los anticuerpos Siglec-15 cargados en frío se unieron fuertemente en la superficie celular. Después de una incubación de 10 minutos a 37°C, el patrón de tinción se vio claramente alterado; los anticuerpos Siglec-15 estaban presentes en puntos internos que probablemente son endosomas (Figura 10B, panel central). Aunque después de 10 minutos, la señal de Siglec-15 todavía estaba cerca de la membrana plasmática, después de 45 minutos se volvió principalmente perinuclear, que es un patrón típico de tinción lisosomal (Toyomura et al., 2003). Esto se confirmó mediante la tinción conjunta de estas células por el marcador de lisosomas LAMP-2. De hecho, a los 45 minutos hubo una localización conjunta sustancial de Siglec-15 y LAMP-2 en las regiones perinucleares, mientras que en los puntos de tiempo anteriores, los patrones de tinción eran claramente divergentes (Figura 10B).

Los lisosomas son sitios principales de degradación del receptor después de la endocitosis. Para determinar si este es el destino de Siglec-15, se trataron los osteoclastos derivados de RAW264.7 con anticuerpos durante un tiempo prolongado y se analizaron los extractos de proteínas totales mediante transferencia Western. Nuestros resultados indican que hubo una clara disminución en los niveles de proteína Siglec-15 a partir de las 3 h de la adición de anti-Siglec-15 (Figura 10C, carriles 4 y 6). En contraste, la exposición de los osteoclastos con un IgG de control no causó esta reducción en la señal. Notablemente, se detectó una reducción similar en los niveles de proteína Siglec-15 en células RAW264.7 diferenciadas con RANKL (durante 4 días) en presencia de anti-Siglec-15 (Figura 10D). Juntos, estos resultados demostraron que los anticuerpos bivalentes anti-Siglec-15 inducen una rápida internalización del receptor, que luego se dirige a los lisosomas para su degradación.

Ejemplo 8

Preparación de lisados celulares e inmunoprecipitación

Los lisados celulares se prepararon utilizando un tampón de lisis mRIPA (Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NP-40 al 1%, desoxicolato al 0,25%, NaCl 150 mM) que contiene proteasa e inhibidores de la fosfatasa (NaF 50 mM, NaVO4 1 mM e inhibidores completos de la fosfatasa sin EDTA 1x Roche). Las concentraciones de proteína lisada se midieron mediante el ensayo BCA (Pierce). Para la transferencia Western de los lisados celulares totales, se desnaturalizaron con calor cantidades iguales de proteína (10-15 µg) en un tampón de muestra de SDS que contenía β-mercaptoetanol, se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10 o 12%, se transfirieron a PVDF y se sondaron con los anticuerpos indicados. Para las inmunoprecipitaciones, se incubaron 2 mg o 1 mg de lisados totales con 4 µg de anticuerpo y 15 µl de perlas de proteína G-Sepharosa durante 4 h, rotando a 4°C. Después de lavar las perlas 4x con mRIPA, se analizó la mitad del material precipitado mediante transferencia Western, como anteriormente.

Interacción entre Siglec-15 y DAP12 y multimerización de Siglec-15

Un estudio reciente demostró que tras la sobreexpresión conjunta de formas marcadas con epítipo de Siglec-15 y DAP12 en células 293T, se pudo detectar un complejo, que dependía de la presencia de K273 (Angata et al., 2007). También se pudo detectar este complejo en condiciones de sobreexpresión similares (datos no mostrados), y se procedió a determinar si el complejo también está presente a niveles de expresión endógenos en osteoclastos. Los lisados de proteína se prepararon a partir de osteoclastos diferenciados derivados de RAW264.7, así como a partir de células de control no diferenciadas, y se realizaron inmunoprecipitaciones utilizando anticuerpos Siglec-15 y DAP12. DAP12 se detectó fácilmente en complejos de proteínas precipitadas con anti-Siglec-15 y, de la misma manera, el anti-DAP12 precipitó abundante Siglec-15. Como se esperaba, con base en los niveles de expresión de la proteína Siglec-15, este complejo era altamente específico de osteoclastos y no se detectó en células no diferenciadas. Notablemente, la expresión de DAP12 no se alteró dramáticamente durante la diferenciación de osteoclastos RAW264.7.

Los estudios previos mostraron que cuando se fosforila en su motivo ITAM, DAP12 es capaz de activar varias vías de señalización, incluidas las cascadas PI3K-Akt, PLCγ y Grb2-Ras-Erk (Turnbull y Colonna, 2007). Sin embargo, la salida de señalización de DAP12 en contextos específicos depende en gran medida de su receptor asociado

(Turnbull y Colonna, 2007). En ausencia de un ligando natural o un compañero molecular identificado para Siglec-15, se utilizó un enfoque de entrecruzamiento de anticuerpos para evaluar la capacidad de Siglec-15 para activar la señalización intracelular. Inicialmente, se trataron los osteoclastos derivados de RAW con anti-Siglec-15 durante múltiples puntos de tiempo de hasta 30 minutos, pero no se observó ninguna activación de Akt, PLCg o Erk (datos no mostrados). Sin embargo, para varios otros receptores asociados a DAP12, se requiere un agrupamiento de orden superior del receptor, en lugar de la dimerización inducida por anticuerpos bivalentes, para inducir la señalización dependiente de ITAM (Turnbull y Colonna, 2007; Underhill y Goodridge, 2007). Para inducir la multimerización, se trataron las células con un anticuerpo primario Siglec-15 seguido de un anticuerpo secundario de entrecruzamiento. En estas condiciones, se observó un efecto de señalización (Figura 11, carriles 5, 8 y 11), con Akt que se fosforila fuertemente a los pocos minutos de la entrecruzamiento del anticuerpo secundario. La fosforilación máxima de Akt se logró después de 5 minutos de tratamiento con anti-Siglec-15 (Figura 11, carril 8). En contraste, fosfo-Erk (Figura 11) y fosfo-PLCg (no mostrado) no fueron modulados. De acuerdo con la falta de expresión de Siglec-15, no hubo activación de Akt en células RAW264.7 no diferenciadas en las mismas condiciones. Asimismo, la sustitución del anticuerpo Siglec-15 primario con una IgG humana de control eliminó la respuesta de señalización (Figura 11, véanse los carriles 3, 6, 9 y 12). Estos resultados demostraron que el entrecruzamiento de Siglec-15 activa específicamente Akt sin afectar a Erk o PLCg, otras dos vías comúnmente más adelante de DAP12 (Turnbull y Colonna, 2007; Underhill y Goodridge, 2007).

Si la inducción de la señalización celular por Siglec-15 depende del motivo ITAM de DAP12, la fosforilación de tirosina de DAP12 debe ser detectable tras el agrupamiento de Siglec-15. Para probar esto, se inmunoprecipitó DAP12 y se evaluó su fosforilación mediante transferencia Western. En los osteoclastos derivados de RAW264.7 estimulados con anticuerpos primarios/secundarios para entrecruzar Siglec-15 (como se describió anteriormente), se detectó una banda de tirosina fosforilada a 12 kDa que es muy probable que sea DAP12. En células no diferenciadas tratadas de la misma manera u osteoclastos tratados con una IgG humana de control, se detectó poca o ninguna fosforilación de DAP12. Cabe destacar que aunque coprecipitó abundante Siglec-15 con DAP12 de los osteoclastos diferenciados (como se esperaba), no se detectó señal de fosfotirosina con su peso molecular (37 kDa), lo que indica que la fosforilación del residuo de tirosina citoplasmática de Siglec-15, parte de su motivo ITIM putativo, no está involucrado en la respuesta de señalización (datos no mostrados). Por lo tanto, nuestros resultados son consistentes con DAP12 que actúa como un módulo de señalización para Siglec-15; DAP12 se fosforila después del agrupamiento de Siglec-15, lo que probablemente conduzca al reclutamiento de moléculas de señalización a su motivo ITAM y la activación de la ruta de Akt.

Los anticuerpos anti-Siglec-15 capaces de inhibir la dimerización o multimerización de Siglec-15 pueden inhibir por lo tanto la actividad de Siglec-15 en osteoclastos o en precursores de osteoclastos. Por ejemplo, para determinar la capacidad de un anticuerpo para inhibir la dimerización o multimerización de Siglec-15, se puede evaluar el nivel de activación de DAP12 (por ejemplo, fosforilación de DAP12) y/o de sus efectores secuencia abajo (ruta de Akt).

Ejemplo 9

40 Comparación de variantes de anticuerpos IgG1 e IgG2

Se procedió a comparar las variantes del anticuerpo IgG1 anti-Siglec-15 humanizado con las variantes correspondientes del anticuerpo IgG2 anti-Siglec-15 humanizado (es decir, los anticuerpos tienen los mismos dominios variables pero la región constante humana de la cadena pesada difiere) y se encontró que, en los experimentos *in vitro* descritos a continuación, las IgG1 son mucho más activas que las IgG2 correspondientes.

Más particularmente, se comparó la actividad de unión de IgG1 L1H1 25E9 humanizada (la variante IgG1 L1H1) con el IgG2 L1H1 25E9 humanizado (la variante IgG2 L1H1) utilizando SPR. El análisis se realizó utilizando procedimientos similares a los descritos anteriormente (véase el Ejemplo 6). En este caso, Fc-Siglec-15 se inmovilizó en el chip y se inyectaron concentraciones decrecientes de las variantes del anticuerpo 25E9 (100 nM, 33,3 nM, 11,1 nM, 3,70 nM y 1,23 nM). El resultado mostró que la afinidad de la variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada por Siglec-15 fue casi 10 veces mayor que la variante IgG2 L1H1 25E9 humanizada con valores KD comparativos de 0,164 nM y 1,26 nM, respectivamente (véase la Figura 12). La diferencia en la unión se debió principalmente a una constante de disociación (kd) más lenta de la IgG1 en comparación con la IgG2. También se examinó la capacidad para inhibir la diferenciación de osteoclastos humanos de la variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada (la variante IgG1 L1H1) y la IgG2 (variante IgG2 L1H1). Las células precursoras de osteoclastos humanos se enriquecieron y se diferenciaron como se describió anteriormente en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos (véase la Figura 13). En presencia de la variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada, se requieren menos de 100 ng/ml de anticuerpo para inhibir completamente la diferenciación de los osteoclastos en este ensayo. Por el contrario, se requieren 10 µg/ml de la variante IgG2 L1H1 25E9 humanizada para obtener el mismo grado de inhibición. Esto representa una diferencia de casi 100 veces en la potencia de la variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada frente a la variante IgG2 correspondiente. En las muestras de control, la diferenciación de los osteoclastos expuestos al vehículo o a una IgG de control a 10 µg/ml no se vio afectada. Aunque el aumento en la potencia de los anticuerpos basados en IgG1 se demostró para la variante L1H1, también se espera tal aumento para las otras variantes humanizadas de 25E9, anticuerpos híbridos o de ratón.

De hecho, también se observó que la potencia de otro anticuerpo humanizado Siglec-15, 25D8, se incrementó en gran medida como IgG1 en comparación con IgG2. Se espera que otros anticuerpos anti-Siglec-15 puedan beneficiarse de tener una región constante de IgG1 humana en lugar de otros tipos de región constante. Dichos anticuerpos pueden identificarse midiendo un aumento en la afinidad del anticuerpo anti-Siglec-15 basado en IgG1 hacia células que expresan Siglec-15 o hacia Siglec-15 recombinante, o probando la capacidad del anticuerpo basado en IgG1 para inhibir la diferenciación o actividad de osteoclastos (*in vitro* o *in vivo*).

Con base en estos resultados, los anticuerpos anti-Siglec-15 basados en IgG1 humana pueden administrarse ventajosamente a una dosificación más baja en humanos.

Ejemplo 10

Conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que se dirigen a Siglec-15

El Solicitante demostró que la unión de un anticuerpo a Siglec-15 expresado en la superficie de los osteoclastos se internalizó y degradó de manera eficiente. Estudios adicionales también indicaron que la internalización siguió la vía endosomal y que el complejo Siglec-15/anticuerpo podría ser localizado conjuntamente con LAMP2, un marcador de endosomas tardíos/lisosomas. Se realizaron experimentos para examinar la viabilidad de direccionar a las células que expresan Siglec-15 con un ADC. La variante IgG1 L1H1 25E9 humanizada se conjugó con una carga útil que es tóxica para las células en proliferación, así como con las células no proliferativas o totalmente diferenciadas, en particular los osteoclastos. El anticuerpo IgG1 L1H1 25E9 humanizado se designó como 25E9-ADC. Dado que la conjugación podría afectar la capacidad de 25E9 para interactuar con Siglec-15 nativo, se realizó una citometría de flujo para medir la unión del 25E9-ADC a las células que expresan Siglec-15. Los experimentos se realizaron como se describió anteriormente utilizando células 293-6E transfectadas con un ADNc que codifica el Siglec-15 humano. Como se ilustra en la Figura 15, el 25E9 no conjugado y el 25E9-ADC interactuaron con las células transfectadas con Siglec-15 con afinidades muy similares (véase las curvas negras, h-Siglec-15). Esto indicó que la reacción de conjugación no alteró la capacidad del 25E9-ADC para unirse a Siglec-15. Como control, las células transfectadas con el plásmido que no contenía el ADNc de Siglec-15 (véase la Figura 15, curvas grises, vector) no se unieron a 25E9, lo que indica que los anticuerpos no se unen a las células de forma no específica.

A continuación se examinó la actividad citotóxica de los anticuerpos. Se aislaron células precursoras de osteoclastos humanos y se sembraron en placas de 96 pocillos en presencia de M-SCF y RANKL, de una manera similar a lo que se describió anteriormente. Se permitió que los osteoclastos se diferenciaron durante 7 días para convertirse en osteoclastos positivos para TRAP completamente multinucleados. Después de la diferenciación, las células se trataron con 25E9 no conjugado, 25E9-ADC o el control-ADC durante 4 días. El número restante de células (% de supervivencia) se determinó utilizando procedimientos calorimétricos estándar. Como se esperaba, el 25E9 no conjugado no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de los osteoclastos humanos (véase la Figura 16). Este resultado estuvo de acuerdo con los resultados previos que muestran que a pesar de la potente inhibición de la diferenciación de osteoclastos por 25E9, el anticuerpo no destruye las células. Por el contrario, el 25E9-ADC mostró una disminución dependiente de la dosis en el número de células supervivientes (Figura 16), un resultado consistente con la citotoxicidad de la toxina administrada. El valor de CI_{50} de esta citotoxicidad estaba en el intervalo sub-nanomolar. El control-ADC, que no se une al Siglec-15 humano, mostró una actividad no específica leve en este ensayo. Al final del estudio, las células se fijaron y se tiñeron para determinar la actividad de la TRAP utilizando procedimientos que se describieron en el Ejemplo 7 para inspeccionar visualmente el efecto de los anticuerpos en los osteoclastos. Como se muestra en la Figura 17, el tratamiento con 25E9 no conjugado (paneles superiores) tuvo un efecto grave en la morfología de los osteoclastos, lo que dio como resultado células pequeñas teñidas con TRAP en forma intensa, que previamente se ha demostrado que no son funcionales y están completamente desprovistas de actividad de resorción (véase la Figura 9). El tratamiento con el 25E9-ADC resultó en la muerte de los osteoclastos y prácticamente todas las células desaparecieron con 1 $\mu\text{g/ml}$ (véase la Figura 17, paneles centrales), un resultado que estuvo de acuerdo con las determinaciones del número de células que se muestran en la Figura 16. Finalmente, el control-ADC no mostró ningún efecto tóxico en los osteoclastos maduros (véase la Figura 17, paneles inferiores) y el número de osteoclastos, incluso a 10 $\mu\text{g/ml}$, fue similar al número observado con las células no tratadas. Estos resultados indican que la citotoxicidad observada con el 25E9-ADC fue específica para los osteoclastos positivos para Siglec-15.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que los ADC que se dirigen a Siglec-15 expresado en la superficie de los osteoclastos tienen actividad citotóxica.

Ejemplo 11

Ensayo funcional in vivo- ratón

La evaluación de la eficacia *in vivo* se adaptó a partir de los procedimientos descritos por Schenk (Muhlbauer et al., 1991) utilizando ratones muy jóvenes que tienen huesos de rápido crecimiento. En resumen, se trataron ratones machos de 3 a 4 semanas de edad (5 animales/grupo) con PBS, una IgG de ratón como control o un anticuerpo anti-Siglec-15 capaz de unirse al Siglec-15 de ratón. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal dos veces

por semana durante cuatro semanas con agujas 26G. Los ratones se sacrificaron y los huesos se diseccionaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 h. Después del lavado en PBS, los huesos se escanearon utilizando un densitómetro PIXImus (GE Medical Systems) para determinar la densidad mineral ósea (DMO) de los fémures, las tibias y las vértebras. Se generaron imágenes tridimensionales de los huesos con un microCT de alta resolución SkyScan (SkyScan Inc., Kontich, Bélgica).

Para estos experimentos, se trataron ratones de 3 a 4 semanas de edad con un anticuerpo anti-Siglec-15 durante cuatro semanas y se evaluaron los efectos de este tratamiento en los huesos largos y las vértebras. Dado que los ratones jóvenes tienen huesos de rápido crecimiento a esta edad, la perturbación de la actividad de los osteoclastos por los antirresortivos puede provocar un aumento rápido y dramático de la densidad mineral ósea (DMO) en un período de tiempo relativamente corto. Después del período de tratamiento, los animales se sometieron a eutanasia, los huesos se diseccionaron y se escanearon por densitometría para calcular la DMO. En comparación con una IgG de ratón de control, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-Siglec-15 resultó en un aumento considerable, dependiente de la dosis, de la DMO en el fémur, la tibia y las vértebras de estos ratones. Con el fin de examinar más a fondo los cambios en la DMO, se analizaron muestras de hueso seleccionadas utilizando microtomografía de rayos X (MicroCT) para analizar su microarquitectura. De acuerdo con el resultado de la densitometría, se observó un aumento marcado del volumen trabecular en los fémures y las vértebras de los ratones tratados con el anticuerpo anti-Siglec-15 en comparación con los ratones tratados con IgG de control y la vértebra L5. De acuerdo con estas observaciones cualitativas, las mediciones cuantitativas de las exploraciones microCT confirmaron el aumento de la densidad mineral ósea en los animales tratados con el anticuerpo Siglec-15. En particular, hubo aumentos estadísticamente significativos en el volumen óseo, la superficie ósea, el número trabecular y la densidad de conectividad. Por el contrario, la separación trabecular se redujo significativamente, un cambio que estuvo en línea con el aumento de la densidad de las estructuras trabeculares.

El objetivo del siguiente estudio fue determinar el efecto de un anticuerpo dirigido a Siglec-15 en el modelo de ovariectomía de rata (OVX).

Treinta y dos ratas Sprague-Dawley fueron operadas de forma simulada u ovariectomizadas y tratadas 12 semanas después con PBS (q28d), anticuerpo Siglec-15 (un anticuerpo anti-Siglec-15 de ratón, 10 mg/kg, q28d) o ácido zoledrónico (ZOL, 0,1 mg/kg, inyección única). Después de un tratamiento de doce semanas, los huesos se analizaron mediante densitometría, microCT, histomorfometría, flexión de 3 puntos (fémur) y compresión axial (LV4) y se analizó el suero para determinar la TRAP 5b y los niveles de ALP.

Como se esperaba, la densidad mineral ósea (DMO) se redujo drásticamente en el grupo OVX-PBS en comparación con los animales de operación simulada, mientras que el tratamiento con ZOL aumentó la DMO. La administración de 25B2 causó un aumento significativo en la DMO en todos los sitios. Estos cambios se confirmaron mediante análisis microCT, que mostraron aumentos significativos en el volumen óseo, el número trabecular (Tb) y las correspondientes reducciones en la separación de Tb en comparación con el grupo de control. Correspondientemente, mediante el análisis biomecánico se observaron mejoras en la resistencia ósea en animales tratados con el anticuerpo anti-Siglec-15 de ratón: se incrementaron los parámetros de carga máxima, rigidez y de energía para provocar falla. El examen de las secciones tibiales mostró que el número de osteoclastos aumentó significativamente con el tratamiento con el anticuerpo anti-Siglec-15 de ratón, pero las células positivas para TRAP fueron más pequeñas y más intensamente teñidas. La TRAP 5b sérica disminuyó en el grupo de anticuerpos anti-Siglec-15 de ratón, lo que concuerda con una disminución en la secreción de esta enzima por parte de los osteoclastos. Curiosamente, el nivel sérico y la tinción histológica de ALP se mantuvieron sin cambios en los animales tratados con anticuerpos. Esto contrasta con el efecto del tratamiento con ZOL, que causó una disminución significativa en la tinción de ALP. El análisis dinámico de histomorfometría con marcación doble con calceína indicó que la tasa de aposición mineral endosteal fue mayor en el grupo tratado con anticuerpos en comparación con los grupos tratados con vehículo y con ZOL, lo que sugiere una estimulación de la formación de hueso nuevo por el anticuerpo anti-Siglec-15.

Tomados en conjunto, nuestros resultados revelan que el direccionamiento de Siglec-15 con un anticuerpo monoclonal en un modelo de pérdida ósea patológica mejora la calidad y la resistencia ósea, probablemente debido a la inhibición combinada de la función de los osteoclastos y al mantenimiento de la actividad de los osteoblastos.

Ensayo funcional in vivo- monos

Para explorar los efectos de la inhibición de Siglec-15 en biomarcadores óseos en primates, se administró el anticuerpo monoclonal humanizado dirigido a Siglec-15, 25E9, a monos cynomolgus hembra deficientes en estrógenos.

Se administraron dos inyecciones intravenosas de vehículo (PBS) o 25E9 a razón de 10 mg/kg a dos grupos en un intervalo de 8 semanas con un período de seguimiento de 6 meses. La deficiencia de estrógeno se indujo por la administración subcutánea repetida de un agonista de la hormona liberadora de gonadotropina cada 4 semanas, comenzando 3 meses antes de administrar 25E9 y durante todo el período de seguimiento. Se recogieron muestras de suero y orina semanalmente para evaluar la resorción ósea y los biomarcadores de formación, determinar el perfil de PK de AB-25E9 y controlar la presencia de anticuerpos anticuerpo-fármaco (ADA).

- El tratamiento con 25E9 disminuyó rápidamente los biomarcadores de la resorción ósea (NTx urinario, CTx sérico y TRAP5b) en un 30% a 45%, lo que demuestra las propiedades antirresortivas de 25E9. Sorprendentemente, los biomarcadores de formación ósea (osteocalcina y BSAP) no disminuyeron rápidamente y se vieron mínimamente afectados. La disminución en los niveles de biomarcadores de la resorción ósea comenzó a atenuarse aproximadamente en la semana 6, lo que coincidió con la aparición de ADA. Curiosamente, esta atenuación no se observó antes de la semana 20 en animales en los que se detectaron pocas o ninguna ADA. De acuerdo con estos hallazgos, la disminución de las concentraciones séricas de AB-25E9 fue más rápida en animales en los que se detectó ADA. En monos que fueron negativos para ADA, la semivida de eliminación terminal de 25E9 varió entre 5 y 12 días.
- En conjunto, los perfiles de biomarcadores presentados aquí muestran que 25E9 tiene actividad antirresortiva y mantiene la formación ósea en monos cynomolgus deficientes en estrógenos. Estos resultados subrayan el nuevo mecanismo de acción del 25E9 y destacan su potencial para la terapia dirigida a osteoclastos de enfermedades relacionadas con los huesos.
- Nuestros experimentos en ratones o monos también incluyeron grupos tratados con 30 mg/kg del anticuerpo anti-Siglec-15. Sorprendentemente, este aumento en la dosis no se asoció con un beneficio adicional. Por el contrario, en algunos casos hubo una disminución en el efecto del anticuerpo a esta dosis en comparación con una dosis de 10 mg/kg.

Referencias

- Stuible M. et al., solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/673.442 presentada el 19 de julio de 2012.
 - Stuible M. et al., solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/777,049 presentada el 12 de marzo de 2013.
 - Stuible M. et al., solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/810,415 presentada el 10 de abril de 2013.
 - Sooknanan, R. R. et al., "Polynucleotides and polypeptide sequences involved in the process of bone remodeling", solicitud internacional No. PCT/CA2007/000210 (publicada el 23 de Agosto de 2007 bajo el No. WO2007/093042).
 - Tremblay, G. B. et al. "Siglec 15 Antibodies in Treating Bone Loss-Related Disease", solicitud internacional No. PCT/CA2010/001586 (publicada el 14 de abril de 2011 bajo el No. WO2011/041894);
 - Hiruma Y. et al., "Antibody Targeting Osteoclast-Related Protein Siglec- 5"; Estados Unidos Ser. No. 12/677.621 publicada el 19 de agosto de 2010 bajo la referencia US2010/0209428A1;
 - Hiruma Y. et al., "Anti-Siglec-15 Antibody", Estados Unidos Ser. No. 13/143.253 publicada el 3 de noviembre de 2011 bajo el No. US2011/0268733A1;
 - Watanabe, I. et al., "Antibody Targeting Osteoclast-Related Protein Siglec-15", solicitud internacional No. PCT/EP2011/005219 publicada el 12 de abril de 2012 bajo el No. WO2012/045481 A2.
- Angata, T., T. Hayakawa, M. Yamanaka, A. Varki, y M. Nakamura. 2006. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J* 20: 1964-1973.
- Angata, T., Y. Tabuchi, K. Nakamura, y M. Nakamura. 2007. Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* 17: 838-846.
- Baron, R., S. Ferrari, y R.G. Russell. 2011. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone* 48: 677-692.
- Blasius, A.L., M. Cella, J. Maldonado, T. Takai, y M. Colonna. 2006. Siglec-H is an IPC- specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107: 2474-2476.
- Blasius, A.L., y M. Colonna. 2006. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol* 27: 255-260.
- Bonifacino, J.S., y L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72: 395-447.
- Boyle, W.J., W.S. Simonet, y D.L. Lacey. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342.
- Crocker, P.R., J.C. Paulson, y A. Varki. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7: 255-266.
- Crocker, P.R., y P. Redelinghuys. 2008. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem Soc Trans* 36: 1467-1471.
- Hiruma, Y., T. Hirai, y E. Tsuda. 2011. Siglec-15, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 424-429.
- Humphrey, M.B., M.R. Daws, S.C. Spusta, E.C. Niemi, J.A. Torchia, L.L. Lanier, W.E. Seaman, y M.C. Nakamura. 2006. TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res* 21 : 237-245.
- Ishida-Kitagawa, N., K. Tanaka, X. Bao, T. Kimura, T. Miura, Y. Kitaoka, K. Hayashi, M. Sato, M. Maruoka, T. Ogawa, J. Miyoshi, y T. Takeya. 2012. Siglec-15 regulates the formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 KDa (DAP12). *J Biol Chem*
- Kaifu, T., J. Nakahara, M. Inui, K. Mishima, T. Momiyama, M. Kaji, A. Sugahara, H. Koito, A. Ujike-Asai, A. Nakamura, K. Kanazawa, K. Tan-Takeuchi, K. Iwasaki, W.M. Yokoyama, A. Kudo, M. Fujiwara, H. Asou, y T. Takai. 2003. Osteopetrosis and thalamic hypomyelination with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin Invest* 111 : 323-332.
- Lanier, L.L. 2009. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 227: 150-160.

- Law, C.L., S.P. Sidorenko, K.A. Chandran, Z. Zhao, S.H. Shen, E.H. Fischer, y E.A. Clark. 1996. CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1 C, Syk, and phospholipase C-gamma(1) upon B cell activation. *J Exp Med* 183: 547-560.
- 5 Liu, Q.Y., R.R. Sookninan, L.T. Malek, M. Ribecco-Lutkiewicz, J.X. Lei, H. Shen, B. Lach, P.R. Walker, J. Martin, y M. Sikorska. 2006. Novel subtractive transcription- based amplification of mRNA (STAR) method and its application in search of rare and differentially expressed genes in AD brains. *BMC Genomics* 7: 286.
- Mao, D., H. Epple, B. Uthgenannt, D.V. Novack, y R. Faccio. 2006. PLCgamma2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *J Clin Invest* 16: 2869-2879.
- 10 Muhlbauer, R.C., F. Bauss, R. Schenk, M. Janner, E. Bosies, K. Strein, y H. Fleisch. 1991. BM 21 .0955, a potent new bisphosphonate to inhibit bone resorption. *J Bone Miner Res* 6: 1003-1011.
- O'Reilly, M.K., y J.C. Paulson. 2009. Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. *Trends Pharmacol Sci* 30: 240-248.
- Paloneva, J., M. Kestila, J. Wu, A. Salminen, T. Bohling, V. Ruotsalainen, P. Hakola, A.B. Bakker, J.H. Phillips, P. Pekkarinen, L.L. Lanier, T. Timonen, y L. Peltonen. 2000. Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP 12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat Genet* 25: 357-361.
- 15 Park-Wyllie, L.Y., M.M. Mamdani, D.N. Juurlink, G.A. Hawker, N. Gunraj, P.C. Austin, D.B. Whelan, P.J. Weiler, y A. Laupacis. 2011 . Bisphosphonate use and the risk of subtrochanteric or femoral shaft fractures in older women. *JAMA* 305: 783-789.
- Raggatt, L.J., y N.C. Partridge. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285: 25103-25108.
- 20 Reid, I.R., y J. Cornish. 2011 . Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol* 8: 90-96.
- Roelofs, A.J., K. Thompson, S. Gordon, y M.J. Rogers. 2006. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 12: 6222s-6230s.
- 25 Sookninan, R.R., G.B. Tremblay, y M. Filion. 2011. Polynucleotides and polypeptide sequences involved in the process of bone remodeling. *Patente de los Estados Unidos* No. 7.989.160.
- Takahata, M., N. Iwasaki, H. Nakagawa, Y. Abe, T. Watanabe, M. Ito, T. Majima, y A. Minami. 2007. Sialylation of cell surface glycoconjugates is essential for osteoclastogenesis. *Bone* 41: 77-86.
- 30 Taylor, V.C., CD. Buckley, M. Douglas, A.J. Cody, D.L. Simmons, y S.D. Freeman. 1999. The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2. *J Biol Chem* 274: 11505-11512.
- Tomasello, E., y E. Vivier. 2005. KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions. *Eur J Immunol* 35: 1670-1677.
- 35 Toyomura, T., Y. Murata, A. Yamamoto, T. Oka, G.H. Sun-Wada, Y. Wada, y M. Futai. 2003. From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺ - ATPase with the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 278: 22023-22030.
- Turnbull, I.R., y M. Colonna. 2007. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* 7: 155-161.
- Underhill, D.M., y H.S. Goodridge. 2007. The many faces of ITAMs. *Trends Immunol* 28: 66-73.
- 40 Walker, J.A., y K.G. Smith. 2008. CD22: an inhibitory enigma. *Immunology* 123: 314-325.
- Walsh, M.C., y Y. Choi. 2003. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 251-263.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente a Siglec-15 y que comprende una cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 7, que excluye la secuencia de señal de la misma, y una cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 13, que excluye la secuencia de señal de la misma.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, conjugado con una fracción citotóxica.
- 10 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, conjugado con una fracción detectable.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de pérdida ósea asociada con enfermedad ósea.
- 15 5. Un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo de la reivindicación 1.
6. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
- 20 7. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5 o que comprende o expresa el anticuerpo de la reivindicación 1.
8. La célula aislada de la reivindicación 7, en la que dicha célula comprende un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y un ácido nucleico que codifica la cadena pesada.
- 25 9. La célula aislada de la reivindicación 8, en la que dicha célula es capaz de expresar, ensamblar y/o secretar un anticuerpo.
10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 11. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo.
12. Un kit que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 13. El anticuerpo para el uso como se define en la reivindicación 4, en el que dicha pérdida ósea está asociada con cáncer, tratamiento del cáncer, osteoporosis, osteopenia, osteomalacia, hiperparatiroidismo, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, tirotoxicosis, mastocitosis sistémica, hipofosfatasa adulta, hiperadrenocorticismo, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad/síndrome de Cushing, síndrome de Turner, enfermedad de Gaucher, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menkes, síndrome de Fanconi, mieloma múltiple, hipercalcemia, hipercalcemia, hipocalcemia, hipocalcemia, artritis, enfermedad periodontal, raquitismo (incluido el raquitismo dependiente de la vitamina D, tipo I y II, y el hipofosfatémico ligado al cromosoma X), fibrogénesis imperfecta osseum, trastornos osteoscleróticos tales como picnodisostosis y daños causados por procesos inflamatorios mediados por macrófagos.
- 40



Figura 1A

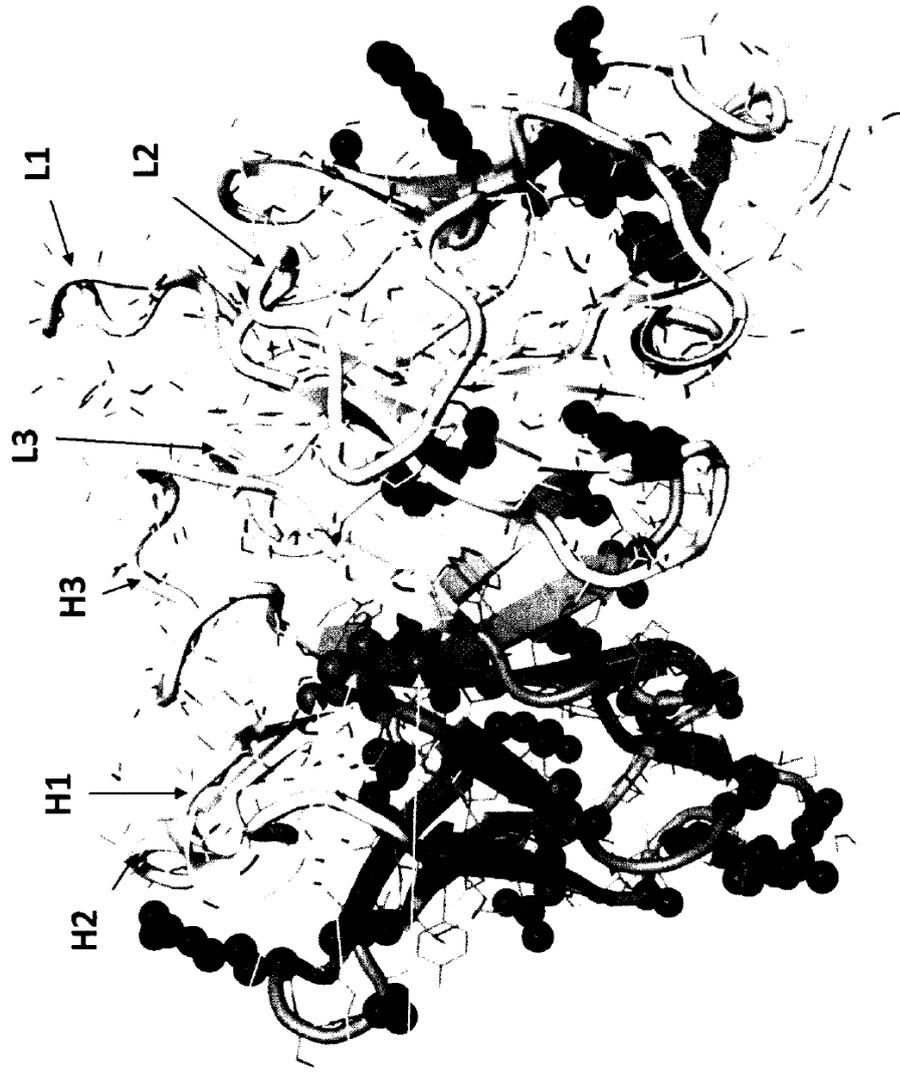


Figura 1B

Ile H2

Ser H94

Thr H93

Figura 4A

Cadena Ligera (Kappa) de 25D8 Humanizada

MVLQTVFISLLLIWISGAYGDIVMTQTPILSLPVTPEGPASISCRSSKSLHSHNGITLYLWYLOKPGQSPQLLIYQMSNLAGCVPDFRFSG
 SSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCAQNLLELPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCILLNFFYPREAKYQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYISLSTLTLTKADYEKHKVIYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:23

Cadena Pesada (Igg2) de 25D8 Humanizada

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQQLQSSGAEVKKEPSSVYKSCKASGYFTSYMHVWRQAPGQGLEMMGLINPNSNARTNYNEKFNTRVTI
 TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYICARGDGDYEDYWGQGTVTVSSASTKGPVFPFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPPTVSW
 NSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFGTQYTCNVDPKSNKVDKVERKCCVCEPCPAPFPVAGPSVFLFPEKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQENWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVYSLTIVVHQLMNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTK
 GQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVYFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:27

Cadena Ligera (Kappa) de 25D8 Quimérica

MVLQTVFISLLLIWISGAYGDIVMTQAAAFSNPVTLTGTSASISCRSSKSLHSHNGITLYLWYLOKPGQSPQLLIYQMSNLAGCVPDFRFS
 SSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCAQNLLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCILLNFFYPREAKYQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYISLSTLTLTKADYEKHKVIYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:21

Cadena Pesada (Igg2) de 25D8 Quimérica

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQVQQAELVKPGASVKLSCKASGYFTSYMHVWKQRPQGLEWIGLINPNSNARTNYNEKFNTRKATL
 TVDKSSSTAYMQLSLSLTSSESAVYICARGDGDYEDYWGQGTTLTVSSASTKGPVFPFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPPTVSW
 NSGALTSGVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTPSSNFGTQYTCNVDPKSNKVDKVERKCCVCEPCPAPFPVAGPSVFLFPEKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQENWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQLMNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTK
 GQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPEMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVYFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:25

Figura 4B

Cadena Ligera (Kappa) de 25E9 Humanizada (Variante 1)

MVLQTVFISLLLWISGAYGDI VMTQSPLSLFPVPEFASI SCRSTKSLHSHNGNTYLYWYLPKPGQSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSG
 SGCSTDFTLKLSRVEAEDVGVYCMQHLEYFFTFGGGTKVEIKRITVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEHKHYACEVTHQGLSEPVTKSFNRGEC SEQ ID NO.:7

Cadena Pesada (Igg2) de 25E9 Humanizada (Variante 1)

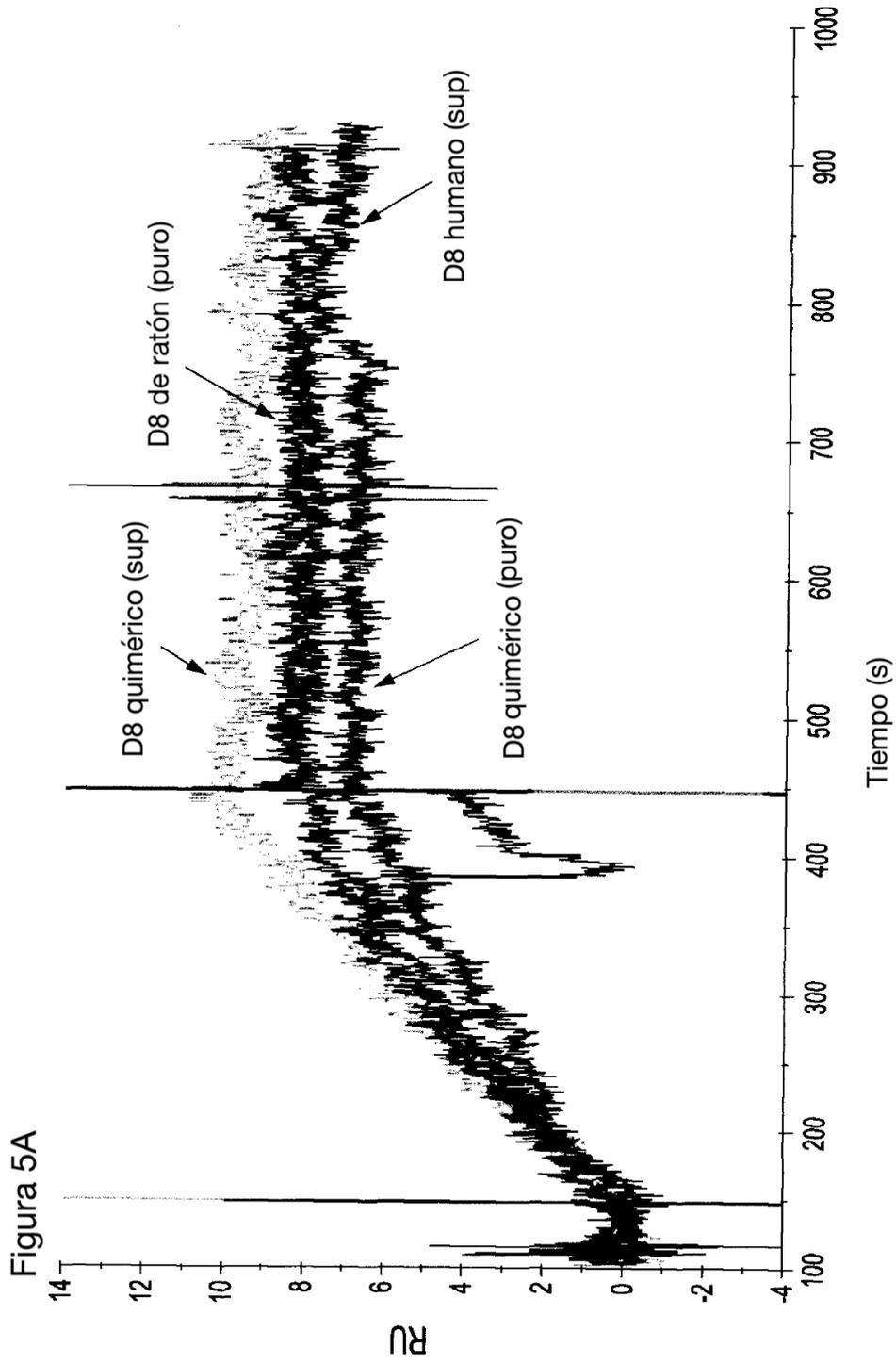
MDWTWRIILFLVAATGTHAFIQLQSGVLYRPGASVTLSCKASGYTFDYMHWVROAPGQGLEWMTIDIDPETGGTAYNQKFKGRVTI
 TADKSTAYMELSSLSEDTAVYICTSFYTYSNYDVGFAFWGQGLIVTVSSASTKGFSEVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
 VIVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSNFGTQYTCNVDRHKSNTKVDKTVBERKCCVCCPPCAPPVYAGPSVFLFPPPK
 PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVVEHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT
 ISKTKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOQGVFES
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO.:29

Cadena Ligera (Kappa) de 25E9 Quimérica

MVLQTVFISLLLWISGAYGDI VMTQAAAPSVPVTPCESVSI SCRSTKSLHSHNGNTLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSG
 SGCSTAFTLKLSRVEAEDVGVYCMQHLEYFFTFGGGTKLEIKRITVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEHKHYACEVTHQGLSEPVTKSFNRGEC SEQ ID NO.:5

Cadena Pesada (Igg2) de 25E9 Quimérica

MDWTWRIILFLVAATGTHAFIQLQSGVLYRPGASVTLSCKASGYTFDYMHWVROAPGQGLEWMTIDIDPETGGTAYNQKFKGRKATL
 TADRSSTAYMELSSLSEDSAVYICTSFYTYSNYDVGFAFWGQGLIVTVSSASTKGFSEVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
 VIVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSNFGTQYTCNVDRHKSNTKVDKTVBERKCCVCCPPCAPPVYAGPSVFLFPPPK
 PKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYDGVVEHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT
 ISKTKGQPREPQVYITLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOQGVFES
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO.:30



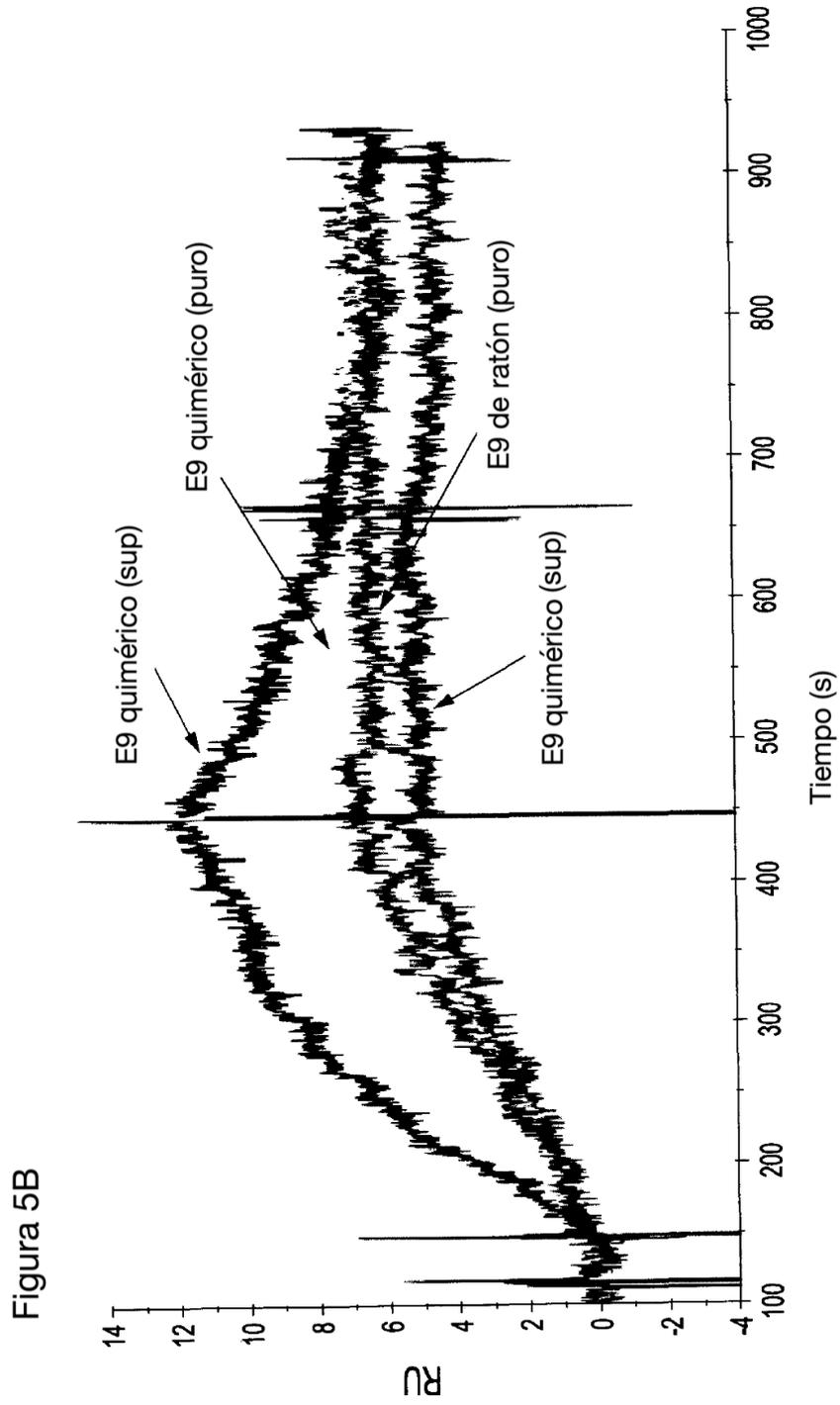


Figura 6A

Alineación
 SEQ6
 SEQ8
 DIVMTQAAPSPVTPGESVSI SCRSTKSLHLSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLA 60
 DIVMTQSPLSLPTPGEPAISICRSTKSLHLSNGNTYLYWYLOKPGQSPQLLIYRMSNLA 60
 *****: *;*****..*****:***:*****:*****
 SEQ6
 SEQ8
 SGVPDRFSGSGGTAFTLIRSRVEAEDGVYYCMQHLEYPFTFGGKLEIK 112
 SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYYCMQHLEYPFTFGGKVEIK 112
 *****:***:*****:*****:***

Figura 6B

SEQ12
 SEQ14
 EIQLOQSGVELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYDMHWVKQTFVHGLEWIGTIDPETGGTAY 60
 EIQLOQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYDMHWVRQAPGQGLEWMGTIDPETGGTAY 60
 *****: *;***:***:*****:***:*****:*****
 SEQ12
 SEQ14
 NQKFKGKATLTADRSSTAYMELSLTSEDSAVYYCTSFYYTYSNYDVGFAYWGQGLVT 120
 NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCTSFYYTYSNYDVGFAYWGQGLVT 120
 *****: *;***:***:*****:***:*****:*****
 SEQ12
 SEQ14
 VSA 123
 VSS 123
 **:

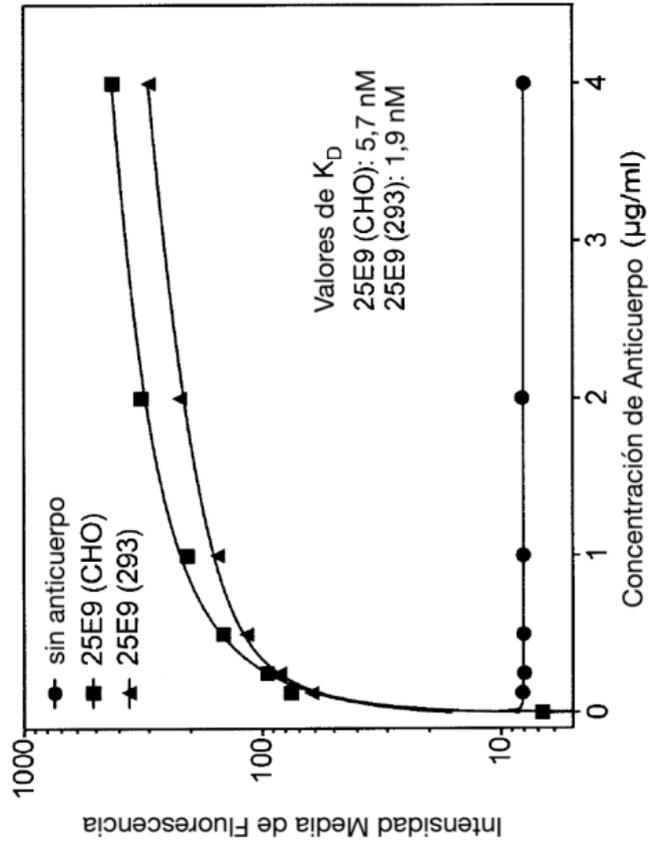
Figura 7A

SEQ22 DIVMTQAAAFSNPVTILGTSASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA 60
 SEQ24 DIVMTQTFPLSLPVTGPEPASISCRSSKSLHSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA 60
 *****:.* *** * . *****:*****
 SEQ22 SGVDRFRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDGVVYCAQNLELPTYTFGGGKLEIK 112
 SEQ24 SGVDRFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDGVVYCAQNLELPTYTFGGGKVEIK 112
 *****:*****:***

Figura 7B

SEQ26 QVQVQOPGAELVKPGASVKLSCKKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGLINPSNARTNY 60
 SEQ28 QVQLQDSGAEVKKPGSSVKVCKKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGLINPSNARTNY 60
 :: ***:***: *****: * *****:*****
 SEQ26 NEKFNTKATLTVDKSSSTAYMQLSSTSEDSAVYVCARGGDGYFDYWGQGTTLTVSS 118
 SEQ28 NEKFNTTRVTTTADKSTSTAYMELSSLRSEDYVYVCARGGDGYFDYWGQGTTLTVSS 118
 *****:*.:.***:*****:***:*****:*****:***

Figura 8



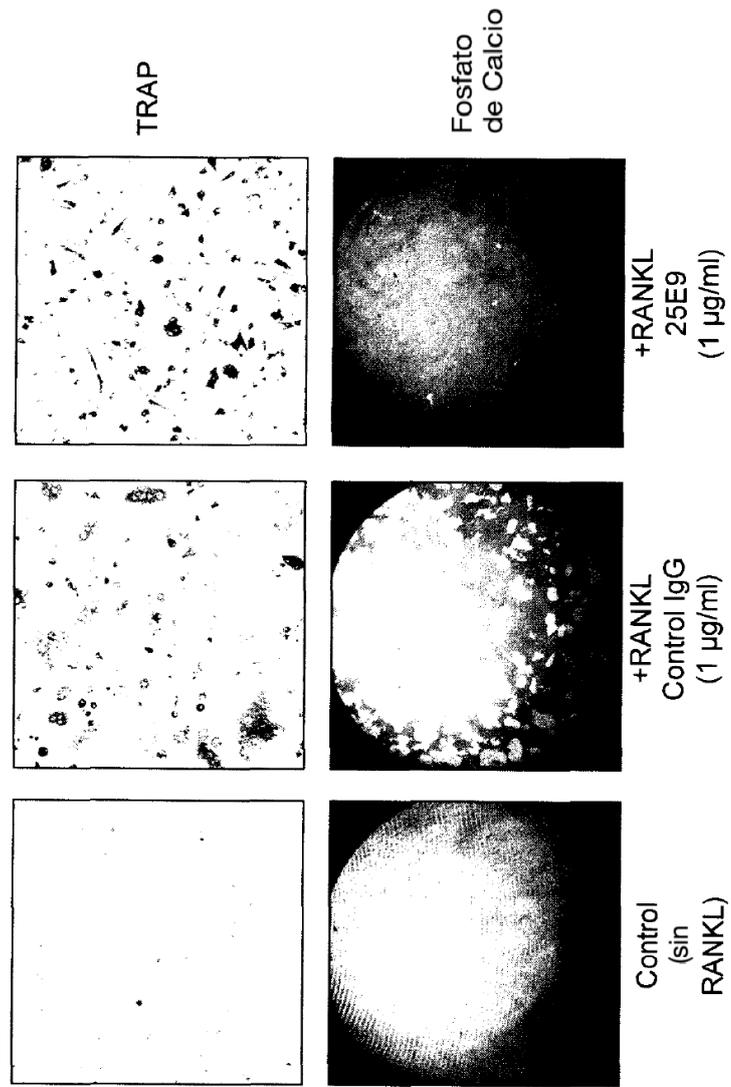


Figura 9

Figura 10

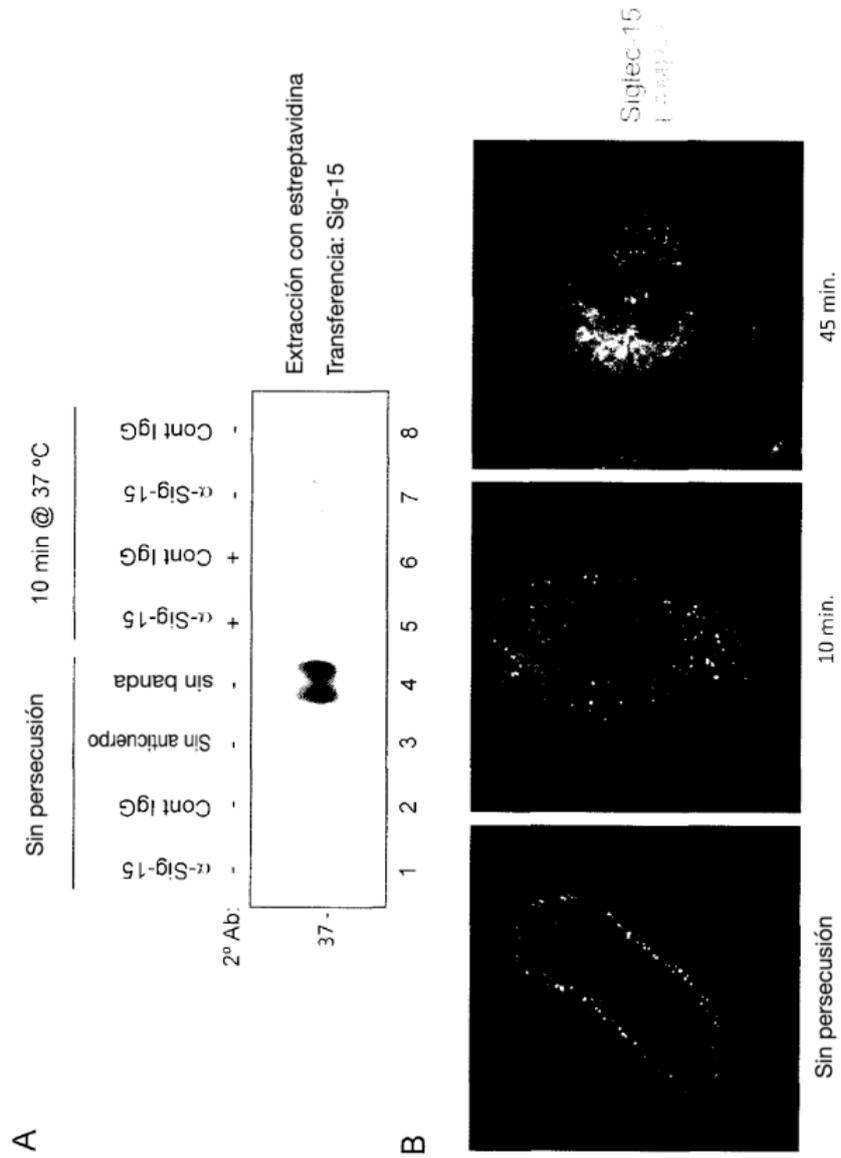


Figura 10

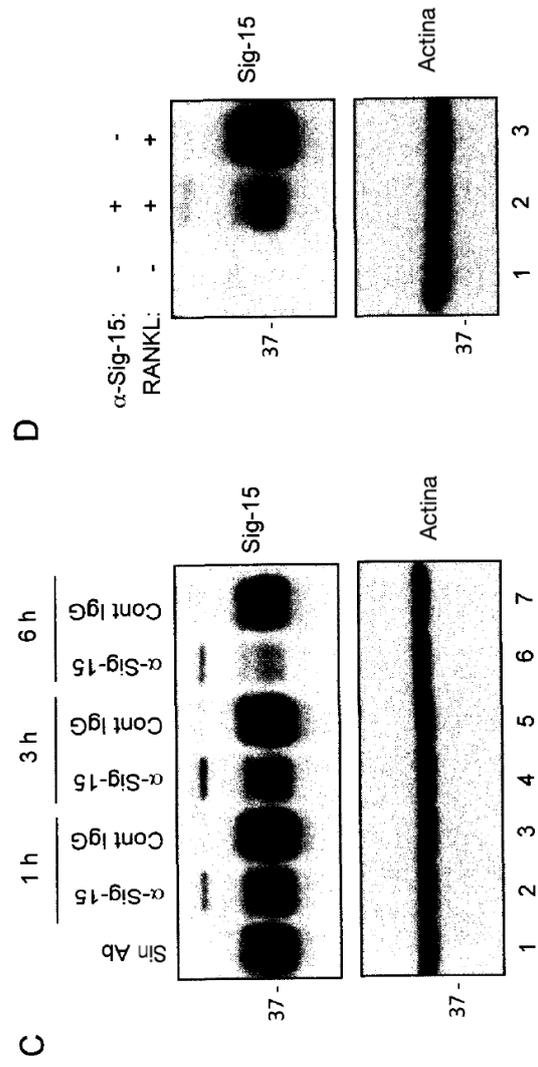
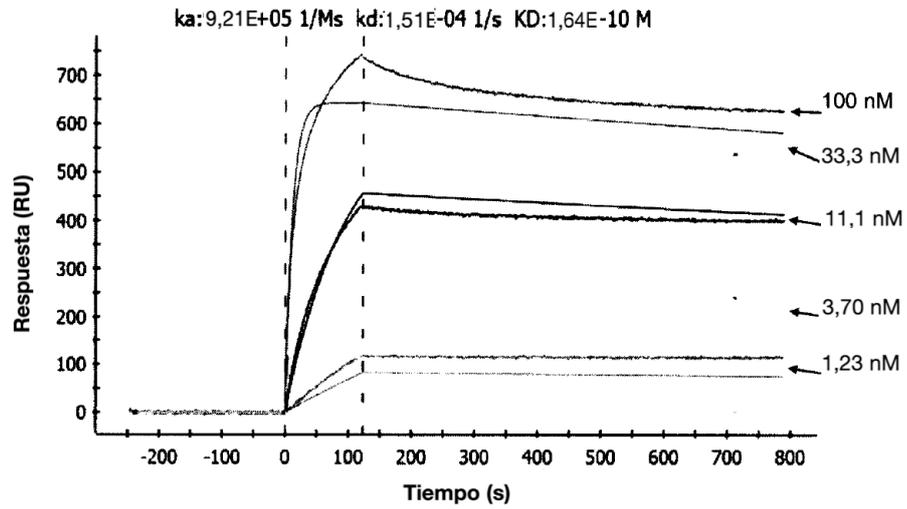
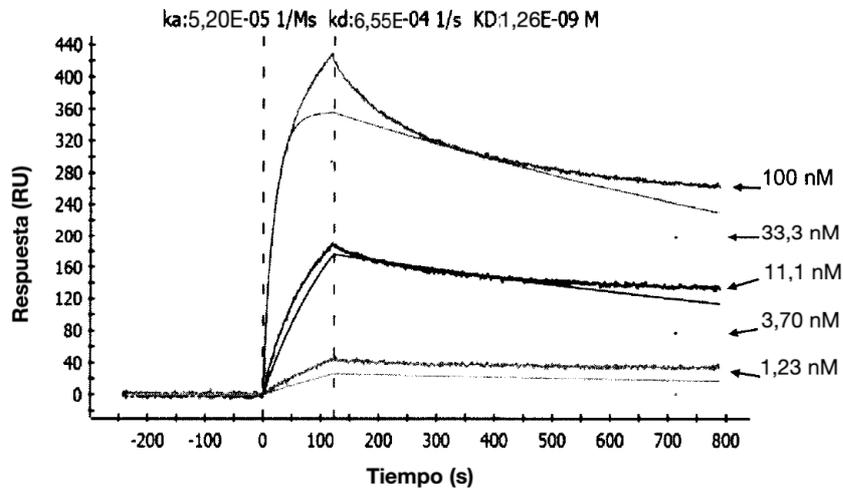


Figura 12



25E9 IgG1 $K_D = 0,164 \text{ nM}$



25E9 IgG2 $K_D = 1,26 \text{ nM}$

Figura 13

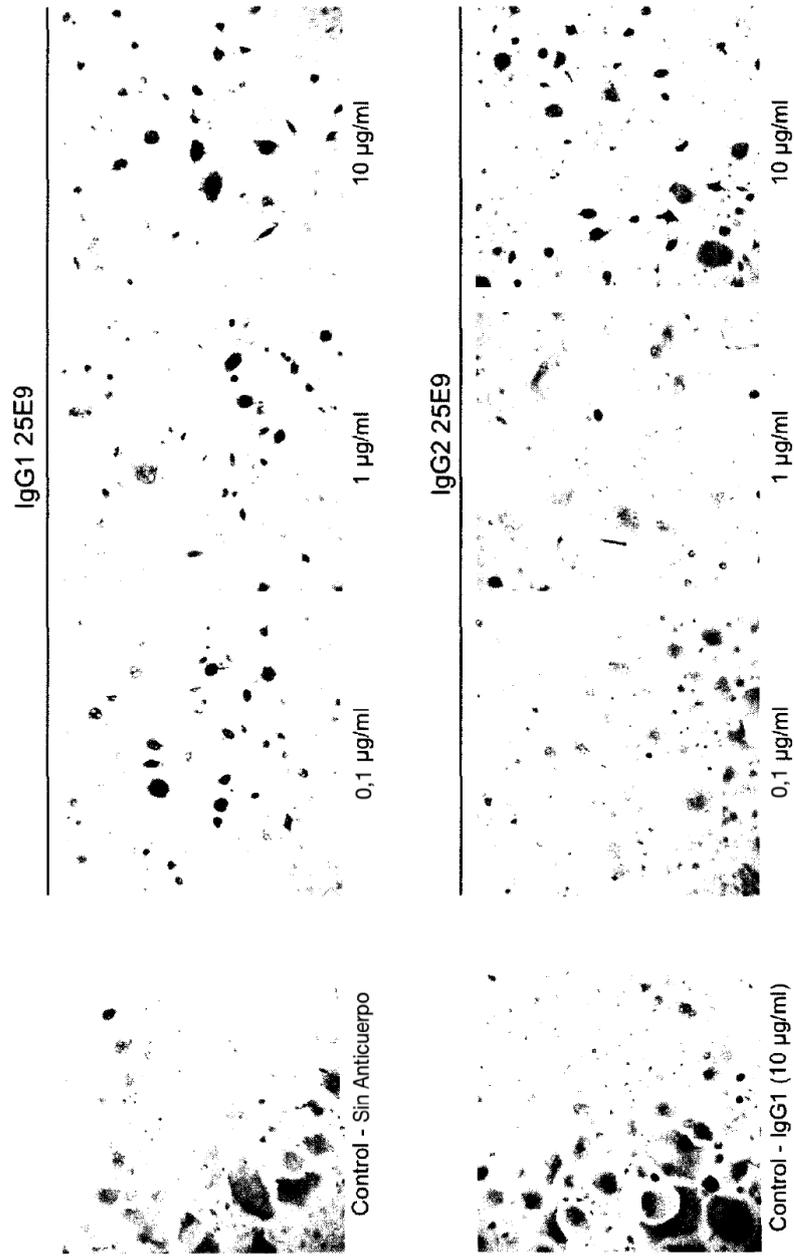


Figura 14A

Cadena Ligera (Kappa) de 25D8 Humanizada

MVLQIQVFIISLLMIISGAYGDIIVMTQIFLSPVTPGEPASISORSSKSLHNSGITYLYWYLOKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPPDRFSG
 SGGIDFTLKRISRVEAEDVGVYCAQNLLELPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKYQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SEQ. ID NO.:23

Cadena Pesada (Igg1) de 25D8 Humanizada

MDWTWRLLFLVAATGTHAQVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTSYMMHWVROAFQGGLEWMLINPSNARTNYNEKFNTRVTI
 TADKSTSTAYMELSSLRSEDIIVYICARGGDDYFDYWGQGTIVYSSASTKGPVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPPTVYSW
 NSGALTSGVHFFAVLQSSGLYSLVVTVPPSSSLGQTYICNVNHPKSNTKYDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELIGGSPVFLFPPKP
 KDTLMIISRTPEVTCVVDVSHEDPEVAFNMYDGVVEVHNAKTPREEQYNSYRVVSVLTVLHODWLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
 SVMHEALHNYTQKLSLSLSPGK SEQ. ID NO.:46

Cadena Ligera (Kappa) de 25D8 Quimérica

MVLQIQVFIISLLMIISGAYGDIIVMTQRAAFSNFVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLOKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPPDRFSS
 SGGIDFTLKRISRVEAEDVGVYCAQNLLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKYQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SEQ. ID NO.:21

Cadena Pesada (Kappa) de 25D8 Quimérica

MDWTWRLLFLVAATGTHAQVQVQPGAEIVRPGASVKLSCKASGYFTSYMMHWVQRPQGGLEWMLINPSNARTNYNEKFNTKATI
 TVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYICARGGDDYFDYWGQGTLLVSSASTKGPVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPPTVYSW
 NSGALTSGVHFFAVLQSSGLYSLVVTVPPSSSLGQTYICNVNHPKSNTKYDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELIGGSPVFLFPPKP
 KDTLMIISRTPEVTCVVDVSHEDPEVAFNMYDGVVEVHNAKTPREEQYNSYRVVSVLTVLHODWLNKGEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
 SVMHEALHNYTQKLSLSLSPGK SEQ. ID NO.:45

Figura 14B

Cadena Ligera (Kappa) de 25E9 Humanizada

(Variante 1)

MVLQTVFISLLLWISGAYGDIIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTKSLHNSNGNTLYLWYLOKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSG
 SSGSTAFTLKISRVEAEDVGYYCMQHLEYPTFFGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNEFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSLSTLTLISKADYEKKHYACEVTHQGLSFPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:7

Cadena Pesada (Igg1) de 25E9 Humanizada

(Variante 1)

MDWTWRILFLVAAATGTHAEIQLQOSGAEVKKEFGSSVXVSKASGYTFTDYDMHWVQAPGGGLEMMGTIDPETGCTAYNQKFKGRVTI
 TADKSTSIAYMELSSLRSEDVAVYYCTSFYYTYSNYDVGFAWGGQTLVTYSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHRPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELIGGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISTRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVKSNKALPAP
 IEKTIISKAKQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOG
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:13

Cadena Ligera (Kappa) de 25E9 Quimérica

MVLQTVFISLLLWISGAYGDIIVMTQAAAPSVPVTPGESVVISCRSTKSLHNSNGNTLYLWYLOKPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSG
 SSGSTAFTLKISRVEAEDVGYYCMQHLEYPTFFGGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNEFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSLSTLTLISKADYEKKHYACEVTHQGLSFPVTKSFNRGEC

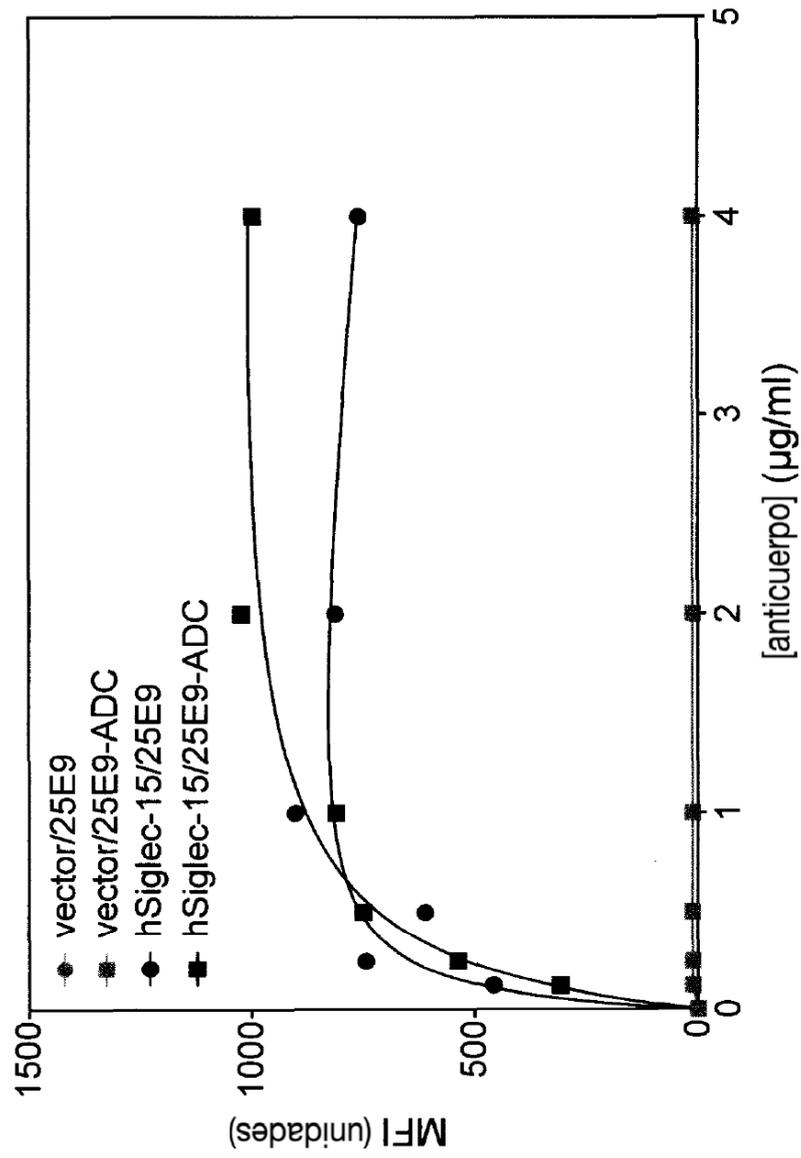
SEQ ID NO.:5

Cadena Pesada (Kappa) de 25E9 Quimérica

MDWTWRILFLVAAATGTHAEIQLQOSGVELVRFGASVILSKASGYTFTDYDMHWVQKQTPVHGLEWIGTIDPETGCTAYNQKFKGKATI
 TADRSTTAYMELSSLTSEDAVYYCTSFYYTYSNYDVGFAWGGQTLVTYSSASTKGESVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHRPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELIGGGPSVFL
 PPKPKDTLMISTRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVKSNKALPAPI
 EKTISKAKQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQOGN
 VVFCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:11

Figura 15



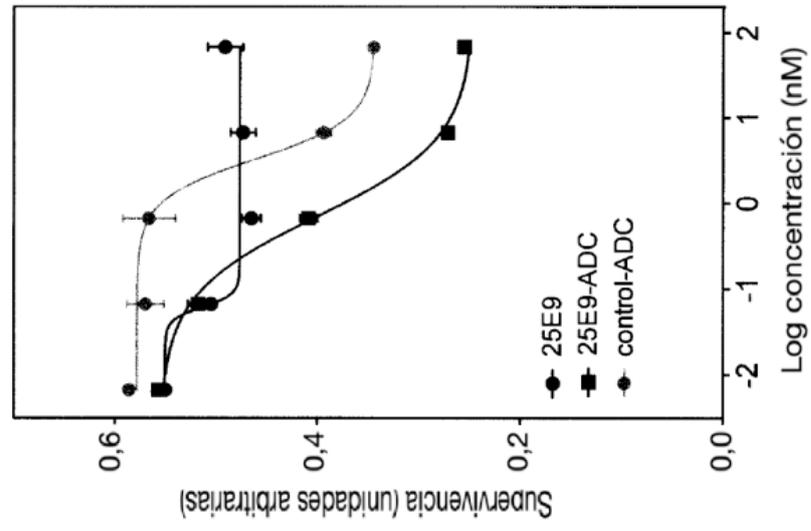


Figura 16

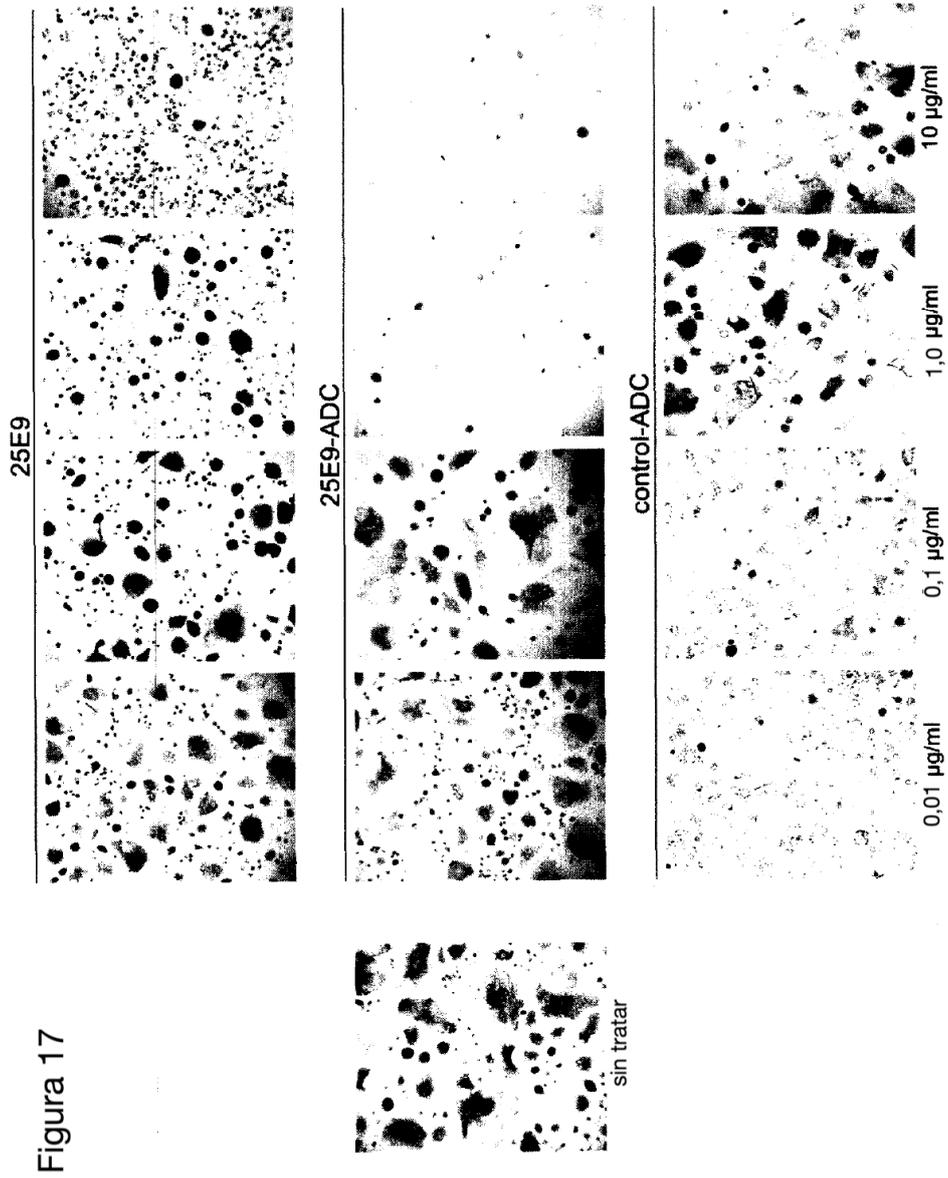


Figura 17