

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 031**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2016 PCT/US2016/032108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016 WO16186957**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2016 E 16736267 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3298037**

54 Título: **Compuestos de anticuerpos biespecíficos ANTI-DKK-1-ANTI-RANKL**

30 Prioridad:

18.05.2015 US 201562163044 P

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

21.04.2020

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**KORYTKO, ANDREW y
OBUNGU, VICTOR H**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 755 031 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

Compuestos de anticuerpos biespecíficos ANTI-DKK-1-ANTI-RANKL

La presente invención pertenece al campo de la medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos de anticuerpos biespecíficos dirigidos contra la proteína 1 relacionada con Dickkopf (Dkk-1) y el activador del receptor del ligando de factor nuclear kappa-B (RANKL). Se espera que los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención sean útiles en la curación ósea, por ejemplo, como un complemento de la cirugía de fusión espinal y/o en el tratamiento de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco, osteogénesis imperfecta o trastornos de masa ósea baja.

Los trastornos óseos afectan a millones de personas, a menudo causando síntomas dolorosos y debilitantes. Algunos trastornos tales como la osteoporosis, la osteopenia y/o la osteogénesis imperfecta pueden requerir intervención terapéutica, tal como un agente que reduce la resorción ósea y/o aumenta la formación de hueso. Otros trastornos, tales como la espondilolistesis lumbar degenerativa y la enfermedad degenerativa del disco pueden requerir intervención terapéutica, tal como cirugía de fusión espinal. La fusión espinal es un procedimiento quirúrgico en el que se inserta una sustancia de injerto (por ejemplo, un injerto óseo) entre las vértebras adyacentes de tal manera que las vértebras se fusionan, limitando o eliminando así el rango de movimiento en el espacio articular entre las vértebras fusionadas. Además de los trastornos óseos anteriores, se realizan fusiones espinales para tratar el dolor y la morbilidad asociados con afecciones degenerativas tales como la enfermedad degenerativa del disco (DDD), la espondilosis y la espondilolistesis; deformidades congénitas, que incluyen cifosis y escoliosis; así como algunas fracturas vertebrales.

Los tipos específicos de procedimientos de fusión espinal incluyen fusión lumbar posterolateral (PLF) y fusión intercorporal (por ejemplo, fusión intercorporal lumbar anterior (ALIF), fusión intercorporal lumbar posterior (PLIF) y fusión intercorporal lumbar transforaminal (TLIF) que difieren de acuerdo con la ubicación y ángulo de aproximación a la columna vertebral). PLF implica colocar una sustancia de injerto entre los procesos transversales de las vértebras lumbares adyacentes en la parte posterior de la columna vertebral y luego asegurar las vértebras a las varillas de metal colocadas a cada lado de las vértebras. La fusión intercorporal implica extraer un disco intervertebral y colocar la sustancia del injerto en el espacio intervertebral entre las vértebras adyacentes, por lo que se produce la fusión entre el injerto y las placas terminales de las vértebras adyacentes. Al igual que con PLF, los procedimientos de fusión intercorporal pueden estabilizarse asegurando las vértebras con varillas, placas, tornillos o alambres de metal.

Durante un procedimiento de fusión espinal, también se puede aplicar un sustituto de injerto óseo (BGS) al injerto y en la unión entre el injerto y las vértebras adyacentes con el fin de estimular el nuevo crecimiento óseo y la fusión entre el injerto y las vértebras. Los BGS a menudo toman la forma de un gel moldeable, masilla, pasta o esponja y comprenden sustancias tales como proteínas formadoras de hueso (por ejemplo, proteínas morfogenéticas óseas) y otros factores de crecimiento (por ejemplo, TGF-beta, PDGF, FGF). Aunque los BGS proporcionan un medio para suministrar la proteína que se necesita necesaria para estimular la formación y fusión de hueso nuevo, la recolección de BGS presenta desafíos y los BGS solo pueden aplicarse durante el procedimiento de fusión espinal.

Aunque los procedimientos de fusión espinal se han llevado a cabo desde principios del siglo XX, tales procedimientos continúan presentando un riesgo significativo. Los riesgos comunes incluyen el riesgo de falla de fusión de las vértebras (pseudoartrosis) y la necesidad de cirugía de revisión, dolor y morbilidad postoperatorios, y el riesgo de infección, lo que puede conducir a tiempos de recuperación potencialmente largos y mayores costes para los pacientes. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de terapias alternativas que puedan conducir a mejores resultados para los pacientes. En particular, sigue existiendo la necesidad de un agente farmacéutico administrado sistémicamente que pueda usarse como una terapia complementaria a los procedimientos de fusión espinal. Preferiblemente, tal agente farmacéutico administrado sistémicamente será capaz de administrarse antes, durante y/o después de un procedimiento de fusión espinal. Adicionalmente, tal terapia alternativa será preferiblemente capaz de demostrar eficacia en la reducción de los riesgos y/o complicaciones asociadas con los procedimientos de fusión espinal y/o en el tratamiento de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco u osteogénesis imperfecta. Los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, dirigidos contra Dkk-1 y RANKL, proporcionan una terapia alternativa que se espera que satisfaga al menos una de las necesidades anteriores.

Dkk-1 es un miembro de la familia de proteínas Dickkopf que se une a las proteínas 5/6 relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5/6) e interrumpe la asociación de LRP5/6 con los complejos de proteínas de la familia Wnt. Los estudios han demostrado que al interrumpir la unión de LRP5/6 a las proteínas de la familia Wnt, Dkk-1 inhibe la ruta de señalización de Wnt, alterando así la osteoblastogénesis y el metabolismo óseo. El papel desempeñado por Dkk-1 en antagonizar la ruta de señalización de Wnt lo hace un objetivo viable para la formación de hueso y las terapias de reparación.

RANKL es miembro de la superfamilia de proteínas TNF y desempeña un papel fundamental en la remodelación ósea. RANKL es expresado por los osteoblastos y se une a su RANK receptor cognado en la superficie de los osteoclastos y las células precursoras de osteoclastos. La unión de RANKL a RANK induce la formación, activación

y supervivencia de osteoclastos maduros y la estimulación de cascadas de señalización intracelular que conducen a un aumento de la resorción ósea. Debido a su papel en la resorción ósea, la inhibición de RANKL se reconoce como un mecanismo para mejorar la densidad mineral ósea en pacientes.

5 Los anticuerpos neutralizantes contra Dkk-1 y RANKL son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la Patente U.S. N° 8.148.498 divulga anticuerpos Dkk-1 para su uso en la curación de huesos y el tratamiento de cánceres. Del mismo modo, la Patente U.S. No. 6.740.522 divulga anticuerpos dirigidos contra RANKL, tal como Denosumab, que está aprobado para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres y hombres posmenopáusicos con alto riesgo de fractura. Además, la Patente U.S. No. 8.338.576 discute posibles terapias combinadas que incluyen un anticuerpo Dkk-1 y uno de diversos agentes óseos anabólicos o antirresortivos, incluidos los inhibidores de RANKL, para el tratamiento de trastornos de la masa ósea.

10 El documento WO 2014/081955 divulga anticuerpos heterodiméricos y sus usos. En particular, los anticuerpos biespecíficos se divulgan como agentes terapéuticos para enfermedades humanas que incluyen un anticuerpo biespecífico anti-esclerostina/anti-DKK-1 para su uso en trastornos óseos.

15 El documento WO 2012/118903 divulga agentes de unión anti-esclerostin/anti-DKK-1 biespecíficos y combinaciones de agentes de unión anti-esclerostina y anti-DKK-1 y procedimientos de tratamiento.

Sin embargo, no existe una terapia combinada aprobada para inhibir tanto la actividad de Dkk-1 como de RANKL. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una terapia alternativa que combine las propiedades de formación ósea de un inhibidor de Dkk-1 con las propiedades de resorción anti-hueso de un inhibidor de RANKL y mejore los resultados de curación ósea en pacientes tales como pacientes con fusión espinal.

20 Un enfoque para tal terapia alternativa puede incluir la coadministración de dos bioproductos diferentes (por ejemplo, anticuerpos). La coadministración requiere bien sea inyecciones de dos productos separados o una inyección única de una coformulación de dos anticuerpos diferentes. Si bien dos inyecciones permiten la flexibilidad de las cantidades de dosis y el tiempo, es inconveniente para los pacientes tanto por el cumplimiento como por el dolor. Además, si bien una coformulación puede proporcionar cierta flexibilidad de las cantidades de dosis, a menudo es bastante desafiante o imposible encontrar condiciones de formulación que tengan una viscosidad aceptable en la solución (a una concentración relativamente alta) y que permitan la estabilidad química y física de ambos anticuerpos debido a diferentes características moleculares de los dos anticuerpos. Adicionalmente, la coadministración y la coformulación implican los costes adicionales de dos terapias farmacológicas diferentes que pueden aumentar los costes del paciente y/o del pagador. Como tal, sigue existiendo la necesidad de terapias alternativas para el tratamiento de trastornos óseos y preferiblemente tales terapias alternativas comprenderán un anticuerpo biespecífico. Sin embargo, a pesar de la divulgación de los anticuerpos anti-Dkk-1 y anti-RANKL descritos anteriormente, un solo anticuerpo biespecífico neutralizante que se une tanto a Dkk-1 como a RANKL no ha sido divulgado en la técnica anterior.

35 La presente invención aborda la necesidad de una terapia alternativa para los procedimientos de fusión ósea. Más particularmente, la presente invención proporciona compuestos de anticuerpos biespecíficos capaces de inhibir la actividad tanto de Dkk-1 como de RANKL. Los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención proporcionan un agente farmacéutico adecuado para la administración sistémica y que puede administrarse antes, durante y/o después de un procedimiento de fusión espinal. Adicionalmente, los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención son útiles como agentes para la curación ósea, por ejemplo, como un complemento de los procedimientos de fusión espinal o en el tratamiento de afecciones asociadas con la pérdida o degeneración ósea.

40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico que comprende dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos en las que cada una de,

45 a.) dicha primera cadena de polipéptidos comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) y una cadena pesada (HC) de mAb IgG, la HC tiene una región variable de cadena pesada (HCVR1) que comprende CDRs de cadena pesada (HCDR) 1-3 en las que la secuencia de aminoácidos de HCDR1 es SEQ ID NO: 9, la secuencia de aminoácidos de HCDR2 es SEQ ID NO: 10, la secuencia de aminoácidos de HCDR3 es SEQ ID NO: 11, y la scFv que tiene una región variable de cadena pesada (HCVR2) y una región variable de cadena ligera (LCVR2), HCVR2 que comprende HCDR 4-6 y LCVR2 que comprende LCDR 4-6, en la que la secuencia de aminoácidos de HCDR4 es SEQ ID NO: 12, la secuencia de aminoácidos de HCDR5 es SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácidos de HCDR6 es SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácidos de LCDR4 es SEQ ID NO: 18, la secuencia de aminoácidos de LCDR5 es SEQ ID NO: 19, y la secuencia de aminoácidos de LCDR6 es SEQ ID NO : 20; y

55 b.) dicho segundo polipéptido comprende una cadena ligera de mAb (LC) que comprende CDRs de cadena ligera (LCDR) 1-3, en las que la secuencia de aminoácidos de LCDR1 es SEQ ID NO: 15, la secuencia de aminoácidos de LCDR2 es SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos de LCDR3 es SEQ ID NO: 17,

en las que cada scFv está unido independientemente a dicha HC a través del enlazador de polipéptido (L1) unido covalentemente al terminal N de HC y al terminal C de LCVR2, y LCVR2 está enlazado a HCVR2 del mismo scFv a través de un segundo enlazador de polipéptido (L2) unido covalentemente al terminal C de LCVR2 y al terminal N de HCVR2.

- 5 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de HCVR1 es SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de LCVR1 es SEQ ID NO: 7, la secuencia de aminoácidos de HCVR2 es SEQ ID NO: 6, y la secuencia de aminoácidos de LCVR2 es SEQ ID NO: 8.

Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de L1 es SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos de L2 es SEQ ID NO: 22.

- 10 Preferiblemente, el compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos en las que la secuencia de aminoácidos de cada uno de los primeros polipéptidos es SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cada uno de los segundos polipéptidos es SEQ ID NO: 2.

- 15 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, cuya célula es capaz de expresar una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

- 20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, cuya célula es capaz de expresar una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención para su uso en terapia.

Preferiblemente, el compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención para su uso en terapia de fusión espinal.

- 30 Más preferiblemente, el compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención para su uso en la curación ósea o en el tratamiento de una cualquiera de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco u osteogénesis imperfecta.

- 35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Preferiblemente, la composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención para su uso en terapia.

Más preferiblemente, la composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención para su uso en terapia de fusión espinal.

- 40 Incluso más preferiblemente, la composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención para su uso en la curación ósea o en el tratamiento de una cualquiera de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco u osteogénesis imperfecta.

- 45 La presente invención proporciona compuestos de anticuerpos biespecíficos que tienen cuatro cadenas de polipéptidos, dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos, en los que cada primera cadena de polipéptidos comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) enlazado independientemente en el terminal C de una cadena pesada de mAb IgG (HC) a través de un enlazador de polipéptido (L1) y cada una de las segundas cadenas de polipéptidos comprende una cadena ligera de mAb (LC). De acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, cada HC comprende una región variable de cadena pesada (HCVR1) con regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1-3 y cada LC comprende una región variable de cadena ligera (LCVR1) con regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera regiones (LCDR) 1-3. Adicionalmente, de acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, cada scFv comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR2) con LCDRs 4-6 y una región variable de la cadena pesada (HCVR2) con HCDRs 4-6. Además, de acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, HCVR2 está enlazado en su N-terminal a

L1 y está enlazado en su C-terminal a un enlazador de polipéptido (L2) que está enlazado al terminal N de LCVR2. De acuerdo con realizaciones particulares de compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de HCDR1 está dada por la SEQ ID NO: 9, la secuencia de aminoácidos de HCDR2 está dada por la SEQ ID NO: 10, la secuencia de aminoácidos de HCDR3 es dada por la SEQ ID NO: 11, la secuencia de aminoácidos de LCDR1 está dada por la SEQ ID NO: 15, la secuencia de aminoácidos de LCDR2 está dada por la SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos de LCDR3 está dada por la SEQ ID NO: 17, la secuencia de aminoácidos de HCDR4 está dada por la SEQ ID NO: 12, la secuencia de aminoácidos de HCDR5 está dada por la SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácidos de HCDR6 está dada por la SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácidos de LCDR4 está dada por la SEQ ID NO: 18, la secuencia de aminoácidos de LCDR5 está dada por la SEQ ID NO: 19, y la secuencia de aminoácidos de LCDR6 está dada por la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones más particulares, la HC comprende un isotipo de mAb IgG4 y cada LC comprende una cadena ligera de mAb kappa.

En algunas realizaciones particulares, la presente invención proporciona compuestos de anticuerpos biespecíficos que tienen cuatro cadenas de polipéptidos, dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos, en las que cada primera cadena de polipéptidos comprende un scFv enlazado independientemente en el terminal C de una HC a través de L1 y cada una de las segundas cadenas de polipéptidos comprenden una LC. De acuerdo con tales realizaciones, cada HC comprende un HCVR1 que tiene una secuencia de aminoácidos dada por la SEQ ID NO: 5 y cada LC comprende un LCVR1 que tiene una secuencia de aminoácidos dada por la SEQ ID NO: 7. Adicionalmente, cada scFv comprende un HCVR2 que tiene una secuencia de aminoácidos dada por la SEQ ID NO: 6 y un LCVR2 que tiene una secuencia de aminoácidos dada por la SEQ ID NO: 8. De acuerdo con los anticuerpos biespecíficos de la presente invención, HCVR2 está enlazado en su N-terminal a L1 y está enlazado a su C-terminal a L2 que está enlazado al terminal N de LCVR2. En algunas realizaciones incluso más particulares, la secuencia de aminoácidos de L1 está dada por la SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos de L2 está dada por la SEQ ID NO: 22.

De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, la presente invención proporciona compuestos de anticuerpos biespecíficos que tienen cuatro cadenas de polipéptidos, dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos, en las que la secuencia de aminoácidos de cada primera cadena de polipéptidos está dada por la SEQ ID NO: 1 y en las que la secuencia de aminoácido de cada segunda cadena de polipéptidos está dada por la SEQ ID NO: 2.

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico y vectores de expresión que codifican compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención. En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la primera cadena de polipéptidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la primera cadena de polipéptidos es la SEQ ID NO: 1. En una realización, la presente invención también proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la segunda cadena de polipéptidos, en la que la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de polipéptidos es la SEQ ID NO: 2. En una realización adicional, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la primera cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la segunda cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En una realización particular, la secuencia de polinucleótidos que codifica la primera cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 está dada por la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de polinucleótidos que codifica la segunda cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 está dada por la SEQ ID NO: 4.

La presente invención también proporciona una célula de mamífero transformada con moléculas de ADN que es capaz de expresar un compuesto de anticuerpo biespecífico que comprende la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos de la presente invención. Además, la presente invención proporciona un proceso para producir un compuesto de anticuerpo biespecífico que comprende la primera cadena de polipéptidos y la segunda cadena de polipéptidos, que comprende cultivar la célula de mamífero bajo condiciones tales que se expresa un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención. La presente invención también proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico producido por dicho proceso.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de un paciente de fusión espinal, por lo que tal tratamiento comprende administrar a un paciente de fusión espinal una composición farmacéutica de la presente invención antes, durante y/o después de la cirugía de fusión espinal. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de un trastorno óseo. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de al menos uno de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco y/u osteogénesis imperfecta, por lo que tal tratamiento comprende administrar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica de la presente invención.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar a un paciente de fusión espinal que comprende administrar a un paciente de fusión espinal una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o composición farmacéutica del mismo, en el que dicho compuesto de anticuerpo biespecífico o composición farmacéutica del mismo se administra a dicho paciente de fusión espinal antes, durante y/o después de la cirugía de fusión espinal. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un trastorno óseo que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o composición farmacéutica del mismo. Realizaciones adicionales de la presente invención proporcionan un procedimiento para tratar al menos uno de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco y/u osteogénesis imperfecta que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o composición farmacéutica del mismo.

La presente invención también proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o composición farmacéutica del mismo para su uso en terapia. Más particularmente, la presente invención también proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o composición farmacéutica del mismo para su uso en el tratamiento de un paciente de fusión espinal. Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno óseo. Además, la presente invención proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o composición farmacéutica del mismo para su uso en el tratamiento de al menos uno de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco y/u osteogénesis imperfecta.

En una realización, la presente invención también proporciona el uso de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente de fusión espinal. Adicionalmente, la presente invención también proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno óseo. Además, la presente invención también proporciona un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención o composición farmacéutica del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco y/u osteogénesis imperfecta.

Como se denomina en este documento, la expresión "compuesto de anticuerpo biespecífico" se refiere a un polipéptido modificado genéticamente que comprende cuatro sitios de unión a antígeno. Dos de los cuatro sitios de unión a antígeno se unen a Dkk-1 y los otros dos sitios de unión a antígeno se unen a RANKL. Un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención es capaz de interactuar con, e inhibir la actividad tanto de Dkk-1 humano como de RANKL solo o simultáneamente. Al combinar las propiedades inhibitorias de Dkk-1 y RANKL en un solo compuesto, se cree que los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención demostrarán la formación de hueso y/o los efectos de resorción anti-hueso en pacientes. Por lo tanto, los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, o las composiciones farmacéuticas de los mismos, pueden ser útiles, por ejemplo, como complementos de la cirugía de fusión espinal y/o en el tratamiento de uno o más trastornos óseos.

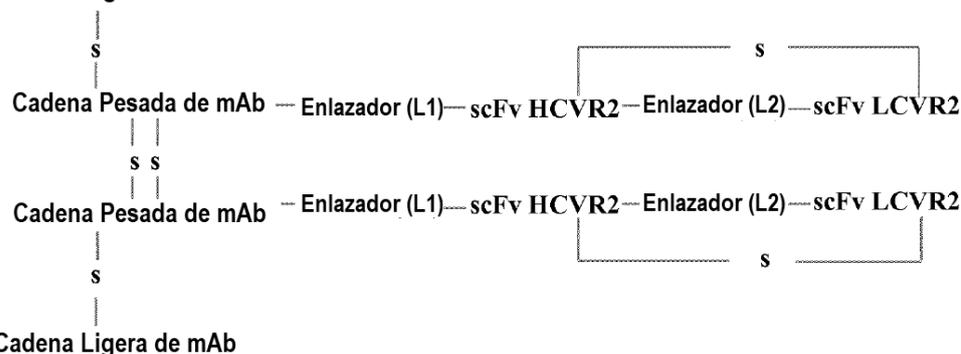
Además, un compuesto de anticuerpo biespecífico, como se menciona aquí, comprende cuatro cadenas de polipéptidos, dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos. Cada una de las primeras cadenas de polipéptidos está diseñada para comprender un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) enlazado en el terminal C de una cadena pesada de mAb (HC) por un enlazador de polipéptido (L1). Cada una de las segundas cadenas de polipéptidos está diseñada para comprender una cadena ligera de mAb (LC) y formar enlaces disulfuro entre cadenas con una de las primeras cadenas de polipéptidos, específicamente dentro de la HC de una primera cadena de polipéptidos. Cada primera cadena de polipéptidos está diseñada para formar enlaces disulfuro entre cadenas con la otra primera cadena de polipéptidos, específicamente entre la HC de cada una de las primeras cadenas de polipéptidos. Cada primera cadena de polipéptidos se diseña adicionalmente para formar enlaces disulfuro entre cadenas, específicamente dentro del scFv de cada primera cadena de polipéptidos respectiva.

Las cadenas de polipéptidos de los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención se representan por su secuencia de aminoácidos desde el terminal N al terminal C, cuando se leen de izquierda a derecha, con cada aminoácido representado bien sea por una letra única o abreviatura de aminoácidos de tres letras. A menos que se indique otra cosa en el presente documento, todos los aminoácidos utilizados en la preparación de los polipéptidos de la presente invención son L-aminoácidos. El "terminal N" (o terminal amino) de un aminoácido, o una cadena de polipéptidos, se refiere al grupo amino libre en el aminoácido, o el grupo amino libre en el primer residuo de aminoácidos de la cadena polipeptídica. Del mismo modo, el "terminal C" (o terminal carboxilo) de un aminoácido, o una cadena de polipéptidos, se refiere al grupo carboxilo libre en el aminoácido, o al grupo carboxilo libre en el residuo de aminoácidos final de la cadena polipeptídica.

Como se menciona en este documento, un "fragmento variable de cadena sencilla" (scFv) de una primera cadena de polipéptidos, se refiere a una cadena de polipéptidos que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR2) y una región variable de cadena ligera (LCVR2) enlazada a través de un conector de polipéptido (L2).

Adicionalmente, como se menciona en este documento (y como se representa en el siguiente esquema), la HCVR2 de cada scFv está: a.) enlazada, en su N-terminal, al terminal C de una HC (de una primera cadena de polipéptidos) por un enlazador de polipéptidos (L1); y b.) enlazada, en su C-terminal, al terminal N de LCVR2 del mismo scFv a través de un segundo enlazador de polipéptidos (L2). Los enlazadores L1 y L2 son típicamente de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos de longitud y ricos en uno o más aminoácidos de glicina, serina o treonina.

Cadena Ligera de mAb



De acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, la HC de cada primera cadena de polipéptidos se clasifica como gamma, que define el isotipo (por ejemplo, como una IgG). El isotipo puede dividirse adicionalmente en subclases (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, and IgG₄). En realizaciones particulares, los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención comprenden cadenas pesadas de mAb del tipo IgG₄. Cada HC está compuesta por una región variable de cadena pesada N-terminal seguida de una región constante (CH), compuesta por tres dominios (C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}) y una región bisagra.

Adicionalmente, de acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, cada cadena ligera de mAb (LC) se clasifica como kappa o lambda y se caracteriza por una región constante particular como se conoce en la técnica. En realizaciones particulares, los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención comprenden LC kappa. Cada LC se compone de una región variable de cadena ligera N-terminal (LCVR1) seguida de una región constante de cadena ligera.

El HCVR1 y LCVR1, de cada HC y LC respectivamente, y HCVR2 y LCVR2, de cada scFv, se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Preferiblemente, las regiones marco de los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano. Cada HCVR1, HCVR2, LCVR1 y LCVR2 de compuestos de anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la presente invención están compuestos por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Aquí, las 3 CDR de cada HCVR1 se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3"; las 3 CDR de cada HCVR2 se denominan "HCDR4, HCDR5 y HCDR6"; los 3 CDR de cada LCVR1 se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3"; y las 3 CDR de cada LCVR2 se denominan "LCDR4, LCDR5 y LCDR6". Las CDR contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La capacidad funcional de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención para unirse a un antígeno particular está influenciada en gran medida por las CDR.

Como se usa indistintamente en el presente documento, "sitio de unión a antígeno" y "región de unión a antígeno" se refiere a aquellas porciones de compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención que contienen los residuos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren especificidad al compuesto de anticuerpo biespecífico y afinidad por un antígeno respectivo. De acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, los sitios de unión a antígeno están formados por un par HCVR1/LCVR1 (de una LC y HC unidas por enlaces disulfuro entre cadenas) y por un par scFv HCVR2/LCVR2. Además, de acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, los sitios de unión a antígeno formados por cada par HCVR1/LCVR1 son los mismos (por ejemplo, comprenden afinidad por un mismo antígeno), y los sitios de unión a antígeno formados por cada par scFv HCVR2/LCVR2 son iguales (por ejemplo, comprende afinidad por un mismo antígeno). Sin embargo, de acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, los sitios de unión a antígeno formados por cada par HCVR1/LCVR1 son diferentes (por ejemplo, comprenden afinidad por un antígeno diferente) de los sitios de unión a antígeno formados por cada par scFv HCVR2/LCVR2. De acuerdo con los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención, el sitio de unión al antígeno formado por un par HCVR1/LCVR1 confiere afinidad por Dkk-1, mientras que el sitio de unión al antígeno formado por un par HCVR2/LCVR2 confiere afinidad por RANKL.

Los términos "numeración de Kabat" o "etiquetado de Kabat" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de

aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo (Kabat, et al. , Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

- 5 Los términos "numeración norte" o "etiquetado norte" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo y se basa, al menos en parte, en la agrupación de propagación de afinidad con una gran cantidad de estructuras cristalinas, como se describe en (North et al., A New Clustering of
10 Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406: 228-256 (2011)).

Ingeniería de anticuerpos biespecíficos

- Se encontraron problemas significativos al intentar construir un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención. Los problemas encontrados incluyeron la ingeniería de un agente único que posee bioactividad compatible y/u óptima tanto para un aumento en la formación ósea como para una disminución en la resorción ósea.
15 Por ejemplo, un compuesto de anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo Dkk-1 (descrito en la Patente U.S. No. 8.148.498) como una de las porciones de mAb o scFv, y un anticuerpo RANKL conocido (tal como Denosumab) como la otra de las porciones de mAb o scFv , no proporciona un agente que tenga una bioactividad compatible y/o aceptable. De hecho, los estudios han demostrado que el perfil de efecto farmacodinámico de Denosumab (para disminuir la resorción ósea) es de seis meses y la vida media es de aproximadamente 35-42 días,
20 mientras que el perfil de efecto farmacodinámico de un anticuerpo Dkk-1 como se describe en la Patente U.S. 8.148.498 (para aumentar la formación de hueso) es un mes y la semivida es de solo aproximadamente 16 días. Tales perfiles de actividad biológica dispares crean un problema para la dosificación, especialmente para el uso terapéutico como complemento de la terapia de fusión espinal (donde se sabe que la curación y la fusión ósea esencial tienen lugar en los primeros tres meses posteriores a la cirugía). Como tal, con el fin de llegar a un compuesto de anticuerpo biespecífico que posee las características sorprendentes e inesperadas de la presente invención, se necesita intervención farmacológica.

- Como resultado de los problemas importantes detallados anteriormente relacionados con la ingeniería de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención, con el fin de llegar a un anticuerpo biespecífico terapéutico que posea un perfil de bioactividad aceptable para su uso como complemento de la cirugía de fusión
30 espinal, se desarrolló y diseñó un novedoso anticuerpo RANKL. Como tal, se diseñó por ingeniería genética un compuesto de anticuerpo biespecífico que comprende una porción de mAb Dkk-1 y una porción scFv de RANKL (descrita con más detalle en este documento). Los compuestos de anticuerpos biespecíficos manipulados de la presente invención comprenden perfiles de bioactividad terapéuticamente aceptables y compatibles para la resorción ósea (disminución) y la formación de hueso (aumento) para su uso como un complemento de la cirugía de fusión
35 espinal. Adicionalmente y de manera sorprendente, las modificaciones manipuladas dieron como resultado un anticuerpo biespecífico que también posee estabilidad, solubilidad, fotoestabilidad, termoestabilidad y viscosidad terapéuticamente aceptables. Ninguna de las modificaciones que dan como resultado los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención son conocimientos generales comunes o de rutina sugeridos o enseñados en la técnica.

Expresión de anticuerpos biespecíficos

- Los vectores de expresión capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados operativamente son bien conocidos en la técnica. Los vectores de expresión pueden codificar un péptido señal que facilita la secreción de los polipéptidos de una célula huésped. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo. Cada una de las primeras cadenas de polipéptidos y las segundas cadenas de polipéptidos pueden expresarse independientemente de diferentes promotores a los que están enlazados operativamente a los que están enlazados operativamente en un vector o, alternativamente, la primera y segunda cadenas de polipéptidos pueden expresarse independientemente de diferentes promotores a los que están enlazados operativamente en dos vectores - uno que expresa la primera cadena de polipéptidos y otro que expresa la segunda cadena de polipéptidos. Los vectores adecuados ejemplares para su uso en la preparación de compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente
50 invención incluyen vectores disponibles de Lonza Biologics tales como pEE 6.4 (para expresar la primera secuencia de polinucleótidos, por ejemplo) y pEE 12.4 (para expresar la segunda secuencia de polinucleótidos, por ejemplo).

- Una secuencia de polinucleótidos de ADN particular que codifica una primera cadena de polipéptidos ejemplificada (que comprende un scFv enlazado en el terminal C de una HC a través de un enlazador de serina de glicina flexible) de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención que tiene la secuencia de aminoácidos de la
55 SEQ ID NO: 1 es proporcionado por la SEQ ID NO: 3 (la secuencia de polinucleótidos de ADN proporcionada por la SEQ ID NO: 3 también codifica un péptido señal). Una secuencia de polinucleótidos de ADN particular que codifica una segunda cadena de polipéptidos ejemplificada (que comprende una LC) de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 es proporcionada por la SEQ ID NO: 4 (la secuencia de polinucleótidos de DNA proporcionada por la SEQ ID NO: 4 también codifica un péptido señal).

Una célula huésped incluye células transfectadas, transformadas, transducidas o infectadas de manera estable o transitoria con uno o más vectores de expresión que expresan una primera cadena de polipéptidos, una segunda cadena de polipéptidos o una primera y una segunda cadena de polipéptidos de la presente invención. La creación y el aislamiento de líneas celulares huésped que producen un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención se puede lograr usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Las células de mamífero son células huésped preferidas para la expresión de anticuerpos biespecíficos. Células de mamífero particulares son CHO, NS0, DG-44 y HEK 293. Preferiblemente, los compuestos de anticuerpos biespecíficos se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, a partir de los cuales los compuestos de anticuerpos biespecíficos pueden recuperarse o purificarse mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, el medio se puede aplicar y eluir de una columna de cromatografía de afinidad de proteína A o G y exclusión por tamaño o cromatografía multimodal Capto usando procedimientos convencionales. Adicionalmente, el agregado soluble y los multímeros pueden eliminarse efectivamente mediante técnicas comunes, que incluyen la exclusión por tamaño, la interacción hidrófoba, el intercambio iónico o la cromatografía de hidroxapatita. El producto puede congelarse inmediatamente, por ejemplo a -70 °C, o puede liofilizarse.

Es bien sabido en la técnica que la expresión de anticuerpos en mamíferos da como resultado la glucosilación. Típicamente, la glucosilación ocurre en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glucosilación altamente conservado. Los N-glucanos típicamente se unen a la asparagina. A modo de ejemplo, cada HC del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado presentado en la Tabla 1 (a continuación) se glucosila en el residuo de asparagina 296 de la SEQ ID NO: 1.

Usos terapéuticos

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" y/o "tratar" pretenden referirse a todos los procesos en los que puede haber una desaceleración, interrupción, suspensión, control o detención de la progresión de los trastornos descritos en este documento, pero no necesariamente indica una eliminación total de todos los síntomas del trastorno. El tratamiento incluye la administración de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención, o composición farmacéutica del mismo, para el tratamiento de una enfermedad o afección en un paciente que se beneficiaría de un nivel disminuido de Dkk-1 y/o RANKL o una disminución de la bioactividad de Dkk-1 y/o RANKL, e incluye: (a) inhibir la progresión adicional de la enfermedad, es decir, suspender su desarrollo; y (b) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad o trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones de la misma. Se espera que el anticuerpo biespecífico de la presente invención sea útil en la curación ósea, por ejemplo como un complemento de la cirugía de fusión espinal y/o en el tratamiento de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco u osteogénesis imperfecta.

Los términos "paciente", "sujeto" e "individuo", usados indistintamente en este documento, se refieren a un ser humano. En algunas realizaciones, un paciente es un ser humano al que se le ha diagnosticado que necesita, se está sometiendo o se ha sometido previamente a un procedimiento de fusión espinal. En algunas realizaciones, un paciente es un ser humano que se caracteriza por estar en riesgo de necesitar o en necesidad de curación ósea, por ejemplo, construcción ósea, remodelación ósea, reparación de fracturas, prevención de pérdida ósea de degeneración y/o que está en riesgo de desarrollar o en necesidad de tratamiento para un trastorno óseo tal como osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco u osteogénesis imperfecta.

Composición farmacéutica

Los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración a un paciente. Los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención están destinados a la administración a través de rutas parentales que incluyen, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal. Adicionalmente, los compuestos de anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden administrarse a un paciente solos o con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable en dosis únicas o múltiples. Tales composiciones farmacéuticas están diseñadas para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se usan diluyentes, vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares según sea apropiado. Dichas composiciones pueden diseñarse de acuerdo con técnicas convencionales divulgadas en, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, que proporciona un compendio de técnicas de formulación como son generalmente conocidos por los practicantes. Los vehículos adecuados para composiciones farmacéuticas incluyen cualquier material que, cuando se combina con un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención, retiene la actividad de la molécula y no es reactivo con el sistema inmunitario del paciente. Una composición farmacéutica de la presente invención comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Una cantidad efectiva de un compuesto de anticuerpo biespecífico de la presente invención se refiere a una cantidad necesaria (a dosificaciones y durante períodos de tiempo y para los medios de administración) para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad efectiva del compuesto de anticuerpo biespecífico o composición

farmacéutica del mismo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del compuesto de anticuerpo biespecífico o porciones del mismo para provocar un respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva también es una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos compensan cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto de anticuerpo biespecífico.

5 **Ejemplos**

Expresión y purificación de anticuerpos biespecíficos

Un anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención se expresa y purifica esencialmente como sigue. Un vector de expresión de glutamina sintetasa (GS) que contiene el ADN de la SEQ ID NO: 3 (que codifica una primera cadena de polipéptidos ejemplificada de la SEQ ID NO: 1 y un péptido señal escindido postraduccionalmente) y la SEQ ID NO: 4 (que codifica una segunda cadena de polipéptido ejemplificada de la SEQ ID NO: 2 y un péptido señal escindido postraduccionalmente) se usa para transfectar una línea celular de hámster chino (CHO, eliminación de GS), mediante electroporación. El vector de expresión codifica un promotor SV Early (Virus Simio 40E) y el gen para GS. La expresión de GS permite la síntesis bioquímica de glutamina, un aminoácido requerido por las células CHO. Después de la transfección, las células se someten a una selección en volumen con 50 µM de L-metionina sulfoximina (MSX). La inhibición de GS por MSX se utiliza para aumentar la rigurosidad de la selección. Las células con integración del ADNc del vector de expresión en regiones transcripcionalmente activas del genoma de la célula huésped pueden seleccionarse contra células CHO de tipo silvestre. Los grupos transfectados se colocan en placas a baja densidad para permitir el sobrecrecimiento cercano hasta clonal de células de expresión estables. Los pocillos maestros se criban para la expresión de anticuerpos biespecíficos y luego se amplían en cultivos en suspensión libres de suero para ser utilizados para la producción.

El medio clarificado, en el que se ha secretado el anticuerpo biespecífico ejemplificado, se aplica a una columna de afinidad de proteína A que se ha equilibrado con un tampón compatible tal como solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La columna se lava para eliminar componentes de unión no específicos. El anticuerpo biespecífico unido se eluye, por ejemplo, por gradiente de pH y se neutraliza, por ejemplo, con Tris, tampón de pH 8. Las fracciones de anticuerpos biespecíficos se detectan, tal como mediante SDS-PAGE o exclusión analítica por tamaño, y luego se agrupan. El agregado soluble y los multímeros se pueden eliminar de manera efectiva mediante técnicas comunes que incluyen exclusión por tamaño, interacción hidrófoba, cromatografía multimodal de Capto, intercambio iónico o cromatografía de hidroxipatita. El anticuerpo biespecífico se concentra y/o se filtra estéril usando técnicas comunes. La pureza del anticuerpo biespecífico ejemplificado después de estas etapas de cromatografía es superior al 98 % (monómero). El anticuerpo biespecífico puede congelarse inmediatamente a -70 °C o almacenarse a 4 °C durante varios meses.

La relación de las diversas regiones y enlazadores que comprenden un compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención, expresado y purificado siguiendo los procedimientos esencialmente como se describe anteriormente, se presenta en la Tabla 1 (la numeración de aminoácidos aplica la numeración lineal; asignación de aminoácidos a dominios variables se basa en el International Immunogenetics Information System® disponible en www.imgt.org; la asignación de aminoácidos a los dominios CDR se basa en las conocidas convenciones de numeración de Kabat y North como se refleja al final de la Tabla 1):

Tabla 1: Regiones de aminoácidos de un anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención.

SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:2		
	Región	Posiciones		Región	Posiciones
HCVR1 Dkk-1 ejemplificado	FRH1-1	1-22	LCVR1 Dkk-1 ejemplificado	FRL1-1	1-23
	HCDR1	23-35		LCDR1	24-34
	FRH1-2	36-49		FRL1-2	35-48
	HCDR2	50-66		LCDR2	49-56
	FRH1-3	67-96		FRL1-3	57-88
	HCDR3	97-108		LCDR3	89-97
	FRH1-4	109-119		FRL1-4	98-107

(continuación)

SEQ ID NO:1			SEQ ID NO:2		
Región constante ejemplificada	CH	120-445	Región constante ejemplificada	CL	108-214
Enlazador ejemplificado	L1	446-460			
HCVR2 RANKL ejemplificado	FRH2-1	461-482			
	HCDR4	483-495			
	FRH2-2	496-509			
	HCDR5	510-526			
	FRH2-3	527-556			
	HCDR6	557-570			
	FRH2-4	571-581			
Enlazador ejemplificado	L2	582-606			
LCVR2 RANKL ejemplificado	FRL2-1	607-629			
	LCDR4	630-640			
	FRL2-2	641-654			
	LCDR5	655-662			
	FRL2-3	663-694			
	LCDR6	695-703			
	FRL2-4	704-713			
CDR	Inicio de residuos de aminoácidos definidos por:		Finalización de residuos de aminoácidos definidos por:		
HCDR1	North		Kabat		
HCDR2	Kabat		Kabat		
HCDR3	North		Kabat		
HCDR4	North		Kabat		
HCDR5	Kabat		Kabat		

(continuación)

CDR	Inicio de residuos de aminoácidos definidos por:	Finalización de residuos de aminoácidos definidos por:
HCDR6	North	Kabat
LCDR1	Kabat	Kabat
LCDR2	North	Kabat
LCDR3	Kabat	Kabat
LCDR4	Kabat	Kabat
LCDR5	North	Kabat
LCDR6	Kabat	Kabat

El compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado presentado en la Tabla 1 comprende dos primeras cadenas de polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y dos segundas cadenas de polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. De acuerdo con el compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado, cada uno de las primeras cadenas de polipéptidos forman un enlace disulfuro intracadena con cada una de las segundas cadenas de polipéptidos entre el residuo de cisteína 133 de la SEQ ID NO: 1 y el residuo de cisteína 214 de la SEQ ID NO: 2; al menos dos enlaces disulfuro intracadena con la otra primera cadena de polipéptidos, el primer enlace disulfuro que se forma intracadena entre el residuo de cisteína 225 (de la SEQ ID NO: 1) de la primera cadena de polipéptidos y el residuo de cisteína 225 (de la SEQ ID NO: 1) de la otra primera cadena de polipéptidos, el segundo enlace disulfuro intracadena que se forma entre el residuo de cisteína 228 (de la SEQ ID NO: 1) de la primera cadena de polipéptidos y el residuo de cisteína 228 (de la SEQ ID NO: 1) de la otra cadena de polipéptidos; y un enlace disulfuro intracadena formado en el scFv de cada primera cadena de polipéptidos entre el residuo de cisteína 504 (de la SEQ ID NO: 1) y el residuo de cisteína 706 (de la SEQ ID NO: 1) de cada primera cadena de polipéptidos respectiva. Además, el compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado presentado en la Tabla 1 está glicosilado en el residuo de asparagina 296 de la SEQ ID NO: 1 de ambos primeros polipéptidos.

Salvo que se indique otra cosa en el presente documento, el compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado mencionado en todos los Ejemplos se refiere al compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención presentado en la Tabla 1.

Análisis de solubilidad y estabilidad de compuestos de anticuerpos biespecíficos

El compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado se formula en uno de tampón citrato 10 mM pH 5,5 o tampón histidina 10 mM pH 5,5. También se evalúa el impacto de NaCl 150 mM y Tween80 al 0,02 % añadido a los tampones respectivos. El compuesto de anticuerpo biespecífico se concentra en las formulaciones de tampón respectivas a 1 mg/ml y 50 mg/ml usando filtros Amicon U.C. (Millipore, catálogo # UFC903024).

La estabilidad del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado se analiza después de la incubación a 25 °C durante 4 semanas. El porcentaje de alto peso molecular (% HMW) se evalúa con cromatografía de exclusión analítica por tamaño (aSEC) usando una columna TSKgel Super SW3000 (producto Tosoh Bioscience # 18675). Se utiliza fosfato de sodio 50 mM + NaCl 350 mM, pH 7,0 como la fase móvil que funciona a 0,4 ml/min durante 15 minutos. Se inyecta un volumen de 5 µl (5 µg) del compuesto de anticuerpo biespecífico concentrado en la columna y la detección se mide a 214 nm. Se inyecta un volumen de 1 µl (50 µg) en la columna y la detección se mide a 280 nm. Los cromatogramas se analizan usando ChemStation y se calcula el % de alto peso molecular (HMW) usando la relación de AUC de los picos eluidos antes del pico de monómero con respecto al AUC total. Estos resultados se resumen en la Tabla 2 (la adición de NaCl y Tween no presentó ningún impacto apreciable en los resultados).

Tabla 2: Cambio en el % de especies HMW desde el inicio del control durante 4 semanas a 25 °C medido por aSEC.

Conc. de muestra	% de cambio de HMW	
	Tampón de Citrato	Tampón de Histidina
1 mg/ml (N= 1)	< 0,4	< 0,4
50 mg/ml (N= 1)	0,46-0,49	0,41-0,59

- 5 La solubilidad del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado se analiza después de la incubación a 25 °C durante una semana. La solubilidad se evalúa con un anticuerpo biespecífico concentrado a 150 mg/ml (usando filtros Amicon U.C., Millipore, número de catálogo UFC903024) y se formula en citrato 10 mM a pH 5,5 incluyendo NaCl 150 mM o histidina 10 mM a pH 5,5 incluyendo NaCl 150 mM. También se evalúa el impacto de Tween80 al 0,02 % agregado a los tampones respectivos. El anticuerpo biespecífico ejemplificado exhibió una solubilidad de al menos 148 mg/ml, dentro de valores aceptables para anticuerpos biespecíficos terapéuticos (la adición de Tween no presentó ningún impacto apreciable en los resultados). El compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado también carecía de separación de fases después del período de incubación.
- 10 La viscosidad del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado se analiza a temperatura ambiente. La viscosidad se evalúa con un compuesto de anticuerpo biespecífico concentrado a 100 mg/ml (usando filtros Amicon U.C., Millipore, número de catálogo UFC903024) y se formula bien sea en citrato 10 mM a pH 5,5 que incluye NaCl 150 mM o histidina 10 mM a pH 5,5 que incluye NaCl 150 mM. El anticuerpo biespecífico ejemplificado, cuando se formuló en citrato exhibió una viscosidad de 3,12 cP y cuando se formuló en histidina exhibió una viscosidad de 4,88 cP, dentro de los valores aceptables para anticuerpos biespecíficos terapéuticos.
- 15 El análisis de fotoestabilidad del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado se evalúa con anticuerpo biespecífico concentrado a 50 mg/ml y formulado en histidina 10 mM, pH 5,5. Las muestras se exponen a 240000 lux hora de luz visible o 40 vatios-hora/m² de luz UV. Las muestras de control ("oscuras") no están expuestas a la luz. Luego, las muestras se analizan en una columna aSEC para determinar el cambio en % de HMW en comparación con las muestras oscuras. Cuando se expuso a la luz UV no se registró ningún cambio en el % de HMW, cuando se expuso a la luz visible se registró un aumento de 1,62 % de HMW. Adicionalmente, la oxidación y desamidación de CDR no aumentan significativamente por la exposición a la luz visible (2,8 %) y la exposición a los rayos UV (0,8 %). Las medidas de fotoestabilidad están dentro de los valores aceptables para los anticuerpos biespecíficos terapéuticos.
- 20 El análisis de congelación y descongelación del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención se evalúa después de tres ciclos de congelación/descongelación realizados de acuerdo con la Tabla 3:
- 25

Tabla 3: Un ciclo de un análisis de congelación-descongelación.

<u>Etapa de ciclo</u>	1	2	3	4	5	6	7	8
Temp. objetivo (°C)	5	-1	-30	-70	-30	-1	0,5	15
Tasa de Temp. (°C/min.)	1	0,05	0,2	1	1	0,2	0,2	1
Retención (min.)	10	750	1	60	1	1000	1	1

- 30 El análisis de congelación/descongelación del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado se evalúa con un compuesto de anticuerpo biespecífico concentrado a 1 mg/ml o 50 mg/ml y se formula en a.) Citrato 10 mM, pH 5,5, con y sin Tween-80 al 0,02 %; o b.) histidina 10 mM, pH 5,5, con y sin Tween-80 al 0,02 %. Se realizan tres ciclos de congelación/descongelación (un ciclo único representado en la Tabla 3) y se evalúa el crecimiento de partículas para cada muestra utilizando un contador de partículas HIAC (Pacific Scientific, p/n. 9703). Los resultados se proporcionan en la Tabla 4.
- 35

Tabla 4: Recuento de partículas después del análisis de congelación/descongelación.

		Recuento de partículas/ml			
	Conc de muestra.	(a) histidina 10 mM, pH 5,5		(b) citrato 10 mM, pH 5,5	
		+Tween80	-Tween80	+Tween80	-Tween80
0 Ciclos de congelación/descongelación	1 mg/ml (N= 1)	< 1000 recuentos/ml	< 1000 recuentos/ml	< 1000 recuentos/ml	< 1000 recuentos/ml
3 Ciclos de congelación/descongelación	50 mg/ml (N= 1)	< 1000 recuentos/ml	< 1000 recuentos/ml	< 1000 recuentos/ml	> 1000 recuentos/ml

Los resultados proporcionados en la Tabla 4 demuestran que el compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención, tanto bajo condiciones de baja como de alta concentración, es estable después de múltiples ciclos de congelación/descongelación.

- 5 Los resultados proporcionados en el presente documento demuestran que el compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención, formulado como se describe en el presente documento, logra una alta solubilidad en la concentración de proteínas (mayor de 150 mg/ml), muestra una degradación de HMW inferior al 0,5 % y posee viscosidad y fotoestabilidad dentro de valores aceptables para anticuerpos biespecíficos terapéuticos.

Afinidad de unión de anticuerpos biespecíficos a Dkk-1 y RANKL

- 10 La afinidad de unión y la estequiometría de unión del anticuerpo biespecífico ejemplificado contra Dkk-1 humano y RANKL humano se determina usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial en un instrumento Biacore 2000 cebado con HBS-EP+ (Hepes 10 mM, pH 7,4 + NaCl 150 mM + EDTA 3 mM + 0,05 % (p/v) de surfactante P20) tampón de ejecución y temperatura de análisis establecida a 25 °C. Se utiliza un chip CM5 (Biacore, p/n. BR-100530) que contiene proteína A inmovilizada (generada usando el acoplamiento de amina NHS-EDC estándar) en las cuatro células de flujo (Fc) para emplear una metodología de captura. Las muestras de anticuerpos se preparan a 0,2-10 µg/ml por dilución en tampón de ejecución. Las muestras de Dkk-1 humano se preparan a concentraciones finales de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,125 nM, 1,5625 nM, 0,78125 nM, 0,390625 nM, 0,1953125 nM, y 0 (blanco) nM por dilución en tampón de ejecución. Los RANKL humanos se preparan a concentraciones finales de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,125 nM, 1,5625 nM, 0,78125 nM, 0,390625 nM, 0,1953125 nM y 0 (blanco) nM por dilución en tampón de ejecución.

- 20 Cada ciclo de análisis consiste en (1) capturar muestras de anticuerpos en células de flujo separadas (Fc2 y Fc3); (2) inyección de cada concentración de Dkk-1 humana sobre todo Fc a 50 µl/min durante 300 segundos seguido de retorno al flujo de tampón durante 1200 segundos para monitorizar la fase de disociación; (3) inyección de cada concentración de RANKL humano sobre todo Fc a 100 µl/min durante 150 segundos seguido de retorno al flujo de tampón durante 1800 segundos para monitorizar la fase de disociación; (4) regeneración de las superficies del chip con inyección de glicina 10 mM, pH 1,5, durante 120 segundos a 5 µl/min en todas las células; y (5) equilibrar las superficies del chip con una inyección de 10 µl (60 segundos) de HBS-EP+. Los datos se procesan utilizando referencias dobles estándar y se ajustan a un modelo de enlace 1:1 usando el software de evaluación Biacore 2000, versión 2.0.3, para determinar la tasa de asociación (k_{activo} , unidades $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tasa de disociación (k_{inactivo} , unidades s^{-1}) y $R_{\text{máx}}$ (unidades RU). La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calcula a partir de la relación $K_D = k_{\text{inactivo}}/k_{\text{activo}}$, y está en unidades molares. Los resultados se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5: Afinidad de unión a Dkk-1 humano y RANKL humano por el anticuerpo biespecífico ejemplificado a 37 °C.

Antígeno	K_{activo} Promedio ($10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_{inactivo} Promedio s^{-1} (10^{-6})	K_D Promedio pM	n
RANKL humano	5,3	4,2	87,4	5
Dkk-1 humano	18,3	6,55	35,7	3

Los resultados proporcionados en la Tabla 5 demuestran que el anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención se une a RANKL humano y Dkk-1 humano con alta afinidad a 25°C.

Neutralización de la reducción inducida por Dkk-1 en la actividad de luciferasa *in vitro*

- 5 Las células MC3T3E1/Topflash preosteoblásticas murinas que se han infectado de manera estable con el informador de luciferasa TCF/LEF se usan para evaluar la capacidad del anticuerpo biespecífico ejemplificado presentado en la Tabla 1 para neutralizar la actividad Dkk-1. Wnt3a induce luminiscencia de luciferasa regulada por TCF/LEF. La Dkk-1 humana bloquea la expresión de luciferasa TCF/LEF inducida por Wnt3a. La neutralización de la actividad Dkk-1 por el anticuerpo biespecífico ejemplificado se mide mediante la cuantificación de la restauración de la luminiscencia de luciferasa.
- 10 Las células MC3T3E1 se cultivan rutinariamente bajo presión selectiva de puromicina 1,25 µg/ml en medio MEMα (Gibco, p/n.A10490-01) que contiene 10 % de FBS (Gibco, p/n. 10082-147) y 1x penicilina/estreptomicina (Hyclone, p/n. SV30010). Se agregan 40.000 células MC3T3E1 por pocillo (en 100 µl) a los pocillos de las placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar, p/n. 3903). Las células se incuban durante la noche a 37 °C (bajo 5 % de CO₂ y 95 % de humedad).
- 15 Wnt3a (R&D, p/n. 5036-WN) se diluye a 0,33 g/ml y la hDkk-1 recombinante se diluye a 1 g/ml en medio de crecimiento. El medio de crecimiento suplementado con Wnt3a y hDkk-1 (en las concentraciones respectivas) se usa para preparar rangos de dosis de 300 nM a 1,23 nM para: a.) anticuerpo biespecífico ejemplificado; b.) un anticuerpo neutralizante Dkk-1 (un anticuerpo Dkk-1 que tiene una cadena principal IgG4 y las mismas secuencias de región variable de cadena pesada y ligera que la porción de mAb del anticuerpo biespecífico ejemplificado); y c.) un anticuerpo neutralizante RANKL (un mAb RANKL IgG4 que tiene las mismas secuencias de CDR que la porción scFv del anticuerpo biespecífico ejemplificado). Los medios de crecimiento se usan para controles "solo medios" y "medios con Wnt3a".
- 20

- Después de la incubación durante la noche, los medios se eliminan y las células se tratan con la concentración o el control del anticuerpo respectivo como se describe anteriormente (por duplicado). Las células se incuban luego durante 3 horas y 30 minutos a 37 °C seguido de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, los tratamientos se eliminan de las células y se añaden 50 µl de tampón de lisis Glo (Promega, p/n. E266A) a las células. Luego, las células se someten a lisis con agitación suave en un agitador de placas durante 5 a 10 minutos. Después de la lisis celular, se añaden 50 µl de reactivo de luciferasa Bright Glo premezclado (Promega, p/n. E620) y se mide la luminiscencia en un lector de placas Multilabel Wallac Victor 1420. Los valores de EC₅₀ y los intervalos de confianza (IC) para todos los grupos de tratamiento se calculan utilizando un modelo de regresión logística de cuatro parámetros con GraphPad Prism 6.
- 25
- 30

- Los resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención neutraliza el bloqueo Dkk-1 humano de la actividad luciferasa TCF/LEF inducida por Wnt3a. La inhibición es comparable a la observada con el anticuerpo Dkk-1 de control positivo (con una EC₅₀ media para el anticuerpo biespecífico ejemplificado de 5,30 nM (IC = 4,12 - 6,82 nM) nM versus 6,61 (CI= 4,92 - 8,86 nM) para el anticuerpo Dkk-1 de control positivo). El anticuerpo RANKL y los controles de medios no neutralizan a Dkk-1 humano del bloqueo de la luciferasa TCF/LEF inducida por Wnt3a en las células MC3T3E1 a ninguna concentración probada. Los resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención neutraliza efectivamente Dkk-1.
- 35

Neutralización de la actividad de luciferasa impulsada por NF-κB inducida por RANKL *in vitro*

- 40 Las células HEK293, que coexpresan de manera estable RANK humana y un indicador de luciferasa impulsado por NF-κB, se usan para evaluar la capacidad del anticuerpo biespecífico ejemplificado presentado en la Tabla 1 para neutralizar la actividad de RANKL. En el modelo de células HEK293 descrito anteriormente, RANK, cuando está unido por RANKL humano, induce la señalización de NF-κB dando como resultado la luminiscencia de luciferasa. La neutralización de la unión de RANKL a RANK, mediante el anticuerpo biespecífico ejemplificado, se mide mediante una reducción de la luminiscencia de luciferasa.
- 45

- Las células HEK293 se cultivan rutinariamente bajo presión selectiva de 700 µg/ml de Geneticina (HyClone, p/n.SV30069.01). Se añaden 25.000 células/pocillo a los pocillos de placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Benton Dickinson, p/n. 354620) en medio de ensayo (50 µl de medio DMEM/F12 (1:3) (Gibco, p/n. 930152DK) que contiene 5 % de FBS (Gibco, p/n. 10082-147), Hepes 20 nM (HyClone, p/n. SH30237.01), 1xGlutaMax (Gibco, p/n. 35050-61) y 1x penicilina/estreptomicina (Hyclone, p/n.SV30010)). Las células se incuban a 37 °C (con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad) durante la noche.
- 50

- Los medios de ensayo que incluyen 100 ng/ml de hRANKL se usan para preparar intervalos de dosis de 100 nM a 0,005 nM (con diluciones en serie 1:3) para cada uno de: a.) El anticuerpo biespecífico ejemplificado; y b.) un anticuerpo neutralizador RANKL (un mAb RANKL IgG4 que tiene las mismas secuencias de CDR que la porción scFv del anticuerpo biespecífico ejemplificado). El medio de ensayo se usa para controles "solo medios" y "medios con 100 ng/ml de RANKL". Todos los grupos de tratamiento se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de agregarlos a las células.
- 55

Después de la incubación durante la noche de las células, se eliminan los medios de crecimiento existentes. Las células se resuspenden en 50 µl de uno de los tratamientos de anticuerpos respectivos (por triplicado) en una de las concentraciones anteriores o en un control de medio de crecimiento. Las células se incuban durante 18 horas a 37 °C (bajo 5 % de CO₂ y 95 % de humedad). Después de la incubación, los medios de crecimiento se eliminan de las células y las células se suspenden en 50 µl de BugLite (2,296 g de DTT (Sigma, p/n.D0632), 1,152 g Coenzima A (Sigma, p/n. C-3019), 0,248 g ATP (Sigma, p/n.A7699) en 1 l 1 % Triton X-100 Tampón de lisis (30 ml Triton X-100 (Fisher, p/n.BP151-500), 3 ml MgCl (Sigma, p/n.M9272), 108,15 ml Trizma HCL 1M (Sigma, p/nT-3253), 41,85 ml 1M Trizma Base (Sigma, p/nT-1503) y 817 ml H₂O)). Luego, las células se someten a lisis con agitación suave en un agitador de placas durante 5 a 10 minutos. Después de la lisis celular, la luminiscencia se mide en un lector de placas multilabel Wallac Victor 1420. Los valores de IC₅₀ para todos los grupos de tratamiento se calculan utilizando un modelo de regresión logística de tres parámetros con GraphPad Prism 6.

Los resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención neutralizó la luminiscencia de luciferasa impulsada por NF-κB inducida por RANKL humano. La inhibición fue comparable a la observada con el anticuerpo RANKL de control positivo (con una IC₅₀ media para el anticuerpo biespecífico ejemplificado de 1,20 nM versus 1,30 nM para el anticuerpo RANKL de control positivo). Los controles de medios no neutralizaron la luminiscencia de luciferasa impulsada por NF-κB inducida por RANKL humano en el modelo celular HEK293 a cualquier concentración probada. Estos resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención neutraliza eficazmente RANKL.

Análisis de eficacia *in vivo* en el modelo de defecto cortical

Los efectos sistémicos sobre la curación de huesos y vértebras, *in vivo*, se evalúan utilizando un modelo de defecto cortical en roedores. Se mantienen ratas desnudas atímicas macho de catorce semanas de edad (Harlan, Indianápolis, IN) en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 22 °C con acceso ad lib a los alimentos (TD 89222 con 0,5 % de Ca y 0,4 % de P, Teklad, Madison, WI) y agua.

La cirugía de defecto cortical se realiza en los ratones, esencialmente como se describe en Komatsu, et al. (Endocrinology, 150: 1570-1579, 2009). En resumen, en el día 0, se perforan agujeros de 2 mm de diámetro a través de las cortezas anterior y posterior a través de la diáfisis de los fémures izquierdo y derecho. El día 1 después de la cirugía, los ratones se dividen en 7 grupos y se les administra una única inyección intraperitoneal de uno de: a.) 1,4 mg/kg de anticuerpo biespecífico ejemplificado (N = 9); b.) 4,2 mg/kg de anticuerpo biespecífico ejemplificado (N= 9); c.) 14 mg/kg de anticuerpo biespecífico ejemplificado (N= 9); d.) 42 mg/kg de anticuerpo biespecífico ejemplificado (N= 9); e.) anticuerpo de control de ensayo Dkk-1 de 3 mg/kg (un mAb Dkk-1 IgG4 que tiene las mismas secuencias de región variable de cadena pesada y ligera que la porción de mAb del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 9); f.) anticuerpo de control del ensayo RANKL de 3 mg/kg (un mAb RANKL IgG4 que tiene las mismas secuencias de CDR que la porción scFv del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 9); y g.) 3 mg/kg de anticuerpo de control negativo IgG4 humano (N= 9). El día 35 se sacrifican los ratones.

En los días 7, 21 y 35, después de la cirugía, la densidad de masa ósea del fémur completo (BMD) se monitoriza longitudinalmente *in vivo* mediante tomografía computarizada cuantitativa (qCT) utilizando el escáner de tomografía computarizada GE Locus Ultra (GE Healthcare, London, Ontario, Canadá). Los resultados se proporcionan en la Tabla 6. De manera similar, en los días 7, 21 y 35, después de la cirugía, se controla la BMD para detectar vértebras lumbares 5 (LV5) mediante qCT. Los resultados se proporcionan en la Tabla 7 (datos presentados como media ± SE, prueba T de Dunnett).

Tabla 6: Análisis de BMD en el sitio del defecto cortical.

	BMD en sitio de defecto cortical (mg/cm ³)		
	Day 7	Day 21	Day 35
Ab de control de IgG4 (3 mg/kg)	387 ± 6	441 ± 6	529 ± 10
Ab biespecífico ejemplificado (1,4 mg/kg)	371 ± 5	476 ± 16	599 ± 17
Ab biespecífico ejemplificado (4,2 mg/kg)	363 ± 7	504 ± 10	676 ± 17
Ab biespecífico ejemplificado (14 mg/kg)	374 ± 8	519 ± 14	708 ± 16
Ab biespecífico ejemplificado (42 mg/kg)	375 ± 5	504 ± 12	686 ± 31

Los resultados presentados en la Tabla 6 demuestran que una dosis única (de 4,2 mg/kg o más) del anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención aumenta la BMD en el defecto cortical tan pronto como el día 21 después de la cirugía en comparación con ratas tratadas con anticuerpo de control IgG4

Tabla 7: Análisis de BMD de LV5.

	% de cambio de BMD de LV5 en comparación con el día 7	
	Día 21	Día 35
Ab de control de IgG4 (3 mg/kg)	-0,49 ± 0,81	1,24 ± 0,61
Ab biespecífico ejemplificado (1,4 mg/kg)	1,90 ± 0,58	3,73 ± 0,94
Ab biespecífico ejemplificado (4,2 mg/kg)	3,01 ± 0,38	4,54 ± 0,53
Ab biespecífico ejemplificado (14 mg/kg)	4,59 ± 0,80	7,17 ± 0,76
Ab biespecífico ejemplificado (42 mg/kg)	4,73 ± 1,77	5,02 ± 1,46

5

Los resultados presentados en la Tabla 7 demuestran que una dosis única del anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención aumenta la BMD en LV5 tan pronto como el día 21 después de la cirugía en comparación con las ratas tratadas con anticuerpo de control IgG4.

Después del sacrificio, se realiza un análisis biomecánico femoral de carga hasta fallo, rigidez del cuello femoral y análisis vertebral de carga a falla. La resistencia biomecánica femoral de carga hasta fallo y la rigidez del cuello femoral se analizan montando la mitad proximal del fémur verticalmente en un mandril a temperatura ambiente y aplicando una fuerza hacia abajo sobre la cabeza femoral hasta la falla. Las vértebras (LV5) se prueban de carga hasta fallo en pruebas de compresión utilizando un dispositivo de prueba de materiales modelo 1/S de MTS y analizando con el software TestWorks 4 (MTS Corp.). La carga máxima se mide como la fuerza máxima sostenida por las vértebras. Los resultados se proporcionan en la Tabla 8.

10

15

Tabla 8: Rigidez femoral; resistencia del cuello femoral; y análisis de resistencia vertebral (media + desviación estándar).

	Rigidez femoral en el sitio del defecto cortical (newtons/mm)	Resistencia Femoral (newtons)	Resistencia Vertebral (newtons)
Ab de control de IgG4 (3 mg/kg)	244 ± 9	83,1 ± 3,7	222 ± 36
Ab biespecífico ejemplificado (1,4 mg/kg)	282 ± 16	92,2 ± 2,2	321 ± 15
Ab biespecífico ejemplificado (4,2 mg/kg)	294 ± 16	102,4 ± 2,3	323 ± 19
Ab biespecífico ejemplificado (14 mg/kg)	330 ± 25	97,7 ± 2,4	335 ± 24
Ab biespecífico ejemplificado (42 mg/kg)	346 ± 23	97,5 ± 2,7	339 ± 25

Los resultados presentados en la Tabla 8 demuestran que una dosis única del anticuerpo biespecífico ejemplificado de la presente invención aumenta la rigidez femoral y la resistencia del cuello femoral, así como la resistencia vertebral en comparación con las ratas tratadas con anticuerpos de control IgG4.

20

Análisis de integración ósea *in vivo*

La integración ósea y la fijación del implante, así como los efectos sistémicos sobre la curación de las vértebras, se evalúan *in vivo* utilizando un modelo de implante de tornillo de tibia de roedor. Las ratas Sprague-Dawley machos de veintitrés semanas de edad (Charles River Labs., Int'l Inc.) se someten a la implantación quirúrgica de un tornillo de titanio (2 x 4 mm) en el lado lateral medial en ambas tibias de las patas traseras. Un día después de la cirugía (día 1), las ratas se dividen en 5 grupos y se les administra una inyección subcutánea de uno de: a.) anticuerpo de control negativo IgG4 de 3 mg/kg (N= 9); b.) anticuerpo de control de ensayo Dkk-1 de 3 mg/kg (un mAb Dkk-1 IgG4 que tiene las mismas secuencias de región variable de cadena pesada y ligera que la porción de mAb del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 9); c.) anticuerpo de control de ensayo RANKL de 3 mg/kg (un mAb RANKL IgG4 que tiene las mismas secuencias de CDR que la porción scFv del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 9); d.) anticuerpo biespecífico ejemplificado de 4,2 mg/kg (N= 9); e.) anticuerpo biespecífico ejemplificado de 14 mg/kg (N = 9); y f.) anticuerpo biespecífico ejemplificado de 4,2 mg/kg en los días 1 y 8 (N= 9). El día 21 se sacrifican las ratas.

Después del sacrificio, se extraen ambas tibias de cada rata, se limpian y se fijan en una solución de etanol/solución salina al 50/50. Se realiza una prueba de fuerza biomecánica de tracción hasta fallo (a una velocidad de 10 mm/min) en cada tibia *ex vivo* utilizando un medidor de fuerza digital industrial (Mark-10, Modelo M3-50, ESM301, Indiana). Adicionalmente, el cambio del Contenido Mineral Óseo (BMC) en L5 también se evalúa en ratas con μ CT para evaluar el efecto sistémico. Los resultados de la evaluación de la fuerza de tracción hasta fallo del implante se proporcionan en la Tabla 9 (datos presentados como media \pm DE, prueba T de Dunnett). Los resultados del cambio de BMC en L5 se proporcionan en la Tabla 10 (datos presentados como media \pm DE, prueba T de Dunnett).

Tabla 9: Análisis de la fuerza de tracción hasta fallo del implante.

Compuesto de estudio	Día(s) de administración	Fuerza de tracción hasta fallo del implante (N)
Ab de control de IgG4 (3 mg/kg)	1	93,0 \pm 4,2
Ab biespecífico ejemplificado (4,2 mg/kg)	1	105,1 \pm 5,1
Ab biespecífico ejemplificado (14 mg/kg)	1	117,0 \pm 6,2
Ab biespecífico ejemplificado (4,2 mg/kg)	1, 8	122,1 \pm 9,5

Los resultados presentados en la Tabla 9 demuestran que tanto la dosis única como la dosis múltiple del anticuerpo biespecífico ejemplificado presentado en la Tabla 1 aumenta la fuerza de tracción hasta fallo del implante de una manera dependiente de la concentración (y la frecuencia) en comparación con ratas tratadas con anticuerpo de control IgG4. Estos datos respaldan el hallazgo de que el anticuerpo biespecífico ejemplificado mejora la integración ósea y la fijación del implante.

Tabla 10: Análisis de cambio de BMC de L5.

Compuesto de estudio	Día(s) de administración	Cambio de BMC (mg)
Ab de control de IgG4 (3 mg/kg)	1	1,231 \pm 0,025
Ab biespecífico ejemplificado (4,2 mg/kg)	1	1,314 \pm 0,022
Ab biespecífico ejemplificado (14 mg/kg)	1	1,312 \pm 0,046
Ab biespecífico ejemplificado (4,2 mg/kg)	1, 8	1,336 \pm 0,0312

Los resultados presentados en la Tabla 10 demuestran que una dosis única de un anticuerpo biespecífico de la presente invención demuestra un efecto sistémico que mejora la BMC de L5 después del implante tibial en comparación con las ratas tratadas con anticuerpo de control IgG4.

Análisis de eficacia *in vivo* en el modelo de fusión lumbar posterior

Los efectos sistémicos sobre la curación de huesos y vértebras en modelos de fusión espinal, *in vivo*, se evalúan utilizando un modelo de fusión lumbar posterior de roedores. Ratas Sprague-Dawley machos de catorce semanas de edad (Charles River Labs., Int'l Inc.), que tienen una masa de entre 450-530 g, se someten a una cirugía de la cresta iliaca izquierda para extraer un autoinjerto óseo de 0,5 x 0,5 cm. El injerto óseo se trasplanta inmediatamente a los procesos transversales decorticados de las vértebras lumbares 5 y 6 (L5 y L6) en la misma rata de la que se recolectó el injerto. En un primer estudio (Estudio 1), un total de 48 ratas se someten a una cirugía de trasplante; en un segundo estudio (Estudio 2), un total de 60 ratas se someten a una cirugía de trasplante. El día de la cirugía (día 0) se toman radiografías digitales para garantizar la colocación del injerto.

El día 3 después de la cirugía, las ratas del grupo de trasplante del Estudio 1 se dividen en 4 grupos y se les administra una inyección subcutánea única de uno de: a.) anticuerpo de control negativo IgG4 de 5 mg/kg (N= 12); b.) anticuerpo de control de ensayo Dkk-1 de 5 mg/kg (un mAb Dkk-1 IgG4 que tiene las mismas secuencias de región variable de cadena pesada y ligera que la porción de mAb del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 12); c.) anticuerpo de control de ensayo RANKL de 5 mg/kg (un mAb RANKL IgG4 que tiene las mismas secuencias de CDR que la porción scFv del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 12); y d.) anticuerpo biespecífico Dkk-1/RANKL de 7,2 mg/kg (ligeramente variado del anticuerpo biespecífico ejemplificado de la Tabla 1 en L1, L2 y secuencias de aminoácidos marco para HCVR2 y LCVR2) (N= 12). El día 28 se sacrifican las ratas.

El día 3 después de la cirugía, las ratas del grupo de trasplante del Estudio 2 se dividen en 5 grupos y se les administra una inyección subcutánea única de uno de: a.) anticuerpo de control negativo IgG4 de 1 mg/kg (N= 12); b.) anticuerpo de control de ensayo Dkk-1 de 1 mg/kg (un mAb Dkk-1 IgG4 que tiene las mismas secuencias de región variable de cadena pesada y ligera que la porción de mAb del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 12); c.) anticuerpo de control de ensayo RANKL de 1 mg/kg (un mAb RANKL IgG4 que tiene las mismas secuencias de CDR que la porción scFv del anticuerpo biespecífico ejemplificado) (N= 12); d.) anticuerpo biespecífico Dkk-1/RANKL de 1,4 mg/kg (ligeramente variado del anticuerpo biespecífico ejemplificado de la Tabla 1 en L1, L2 y secuencias de aminoácidos marco para HCVR2 y LCVR2) (N= 12); y e.) anticuerpo biespecífico Dkk-1/RANKL de 7,2 mg/kg (ligeramente variado del anticuerpo biespecífico ejemplificado de la Tabla 1 en L1, L2 y secuencias de aminoácidos marco para HCVR2 y LCVR2) (N= 12). El día 28 se sacrifican las ratas.

Después del sacrificio, todas las ratas se evalúan para determinar la tasa de fusión espinal y calidad. Las ratas del grupo de trasplante del estudio 1 se evalúan para determinar el cambio de BMD, con μ CT, en las vértebras lumbares 3 (L3, vértebras sin trasplante) para evaluar el efecto óseo sistémico. La tasa de la fusión espinal y la calidad se evalúan utilizando imágenes de micro CT 3D (μ CT40) con una resolución de 36 μ m por vóxel. Las imágenes 3D obtenidas se utilizan para evaluar la fusión del tejido óseo utilizando un sistema de puntuación: 0 = sin fusión; 3 = fusión parcial; y 5 = fusión completa, donde la tasa de fusión es el porcentaje de puntajes de fusión parcial y total combinados en cada grupo. Los resultados de la tasa de fusión espinal y calidad (en L5 y L6) se proporcionan en la Tabla 11 (datos presentados como puntaje promedio \pm DE, prueba exacta de Fisher). Los resultados del cambio de BMD en L3 (en el grupo de trasplante del Estudio 1) se proporcionan en la Tabla 12 (datos presentados como media \pm DE, prueba T de Dunnett).

Tabla 11: Análisis de tasa de fusión espinal y calidad en el modelo de fusión lumbar posterior.

Grupo de trasplante	Compuesto de estudio	Tasa de fusión (%)	Calidad de fusión (puntuación promedio)
Estudio 1	Ab de control de IgG4 (5 mg/kg)	58	2,50 \pm 1,51
	Ab biespecífico de Dkk-1/RANKL (7,2 mg/kg)	100	3,83 \pm 1,03
Estudio 2	Ab de control de IgG4 (1 mg/kg)	50	2,40 \pm 1,56
	Ab biespecífico de Dkk-1/RANKL (1,4 mg/kg)	92	3,30 \pm 1,15
	Ab biespecífico de Dkk-1/RANKL (7,2 mg/kg)	82	4,10 \pm 1,64

Los resultados presentados en la Tabla 11 demuestran que una dosis única de un anticuerpo biespecífico de la presente invención aumenta la tasa de fusión y la calidad en los sitios de fusión lumbar posterior tan pronto como el día 28 días después de la cirugía en comparación con las ratas tratadas con anticuerpos de control IgG4.

Tabla 12: Análisis de cambio de BMD del hueso adyacente en el modelo de fusión lumbar posterior.

Grupo de trasplante	Compuesto de estudio	Cambio de BMD (mg/cm ³)
Estudio 1	Ab de control de IgG4 (5 mg/kg)	461,73 ± 13,08
	Ab biespecífico de Dkk-1/RANKL (7,2 mg/kg)	510,46 ± 6,04

5 Los resultados presentados en la Tabla 12 demuestran que una dosis única de un anticuerpo biespecífico de la presente invención demuestra un efecto sistémico que mejora la BMD del hueso de las vértebras adyacentes después de un procedimiento de fusión lumbar posterior tan pronto como el día 28 días después de la cirugía en comparación con ratas tratadas con anticuerpo de control IgG4

Secuencias

SEQ ID NO: 1 – Primer polipéptido ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado de la Tabla 1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGG
 GFGTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGYNNYYFDI
 WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
 SKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG
 LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFT
 NYYIEWVRQAPGQCLEWMGVINPGWGDNTYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMEL
 SSLRSED TAVYYCARRDTAHGYALDPWGQGTTVTVSSGGGGGSGGGGSGGGGS
 GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAWYQQKPKGKAP
 KLLIYSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYWDYPLTFGC
 GTKVEIK

10 **SEQ ID NO: 2 - Segundo polipéptido ejemplificado (del compuesto de anticuerpo biespecífico ejemplificado de la Tabla 1)**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYARQSIQG
 IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQSESWPLHFGGGKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYQKQVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 3 – Seq. de ADN que codifica que codifica el primer polipéptido ejemplificado (SEQ ID NO.1) y un péptido señal

atggagacggacactctcctctgtgggtattgctcctttgggtccctggttctacaggggaggtacagctggtagaaagcgggtg
ggggattggtacaaccaggtggatctctccgggtgcatgtgcagctagtggtttaccttccagttatacagatgtcttgggtgag
acaagcggccggtaaaggattggagtggtgcgaacatcagtgaggagggttggaaactactacctgatacggttaagg
ggcggttaccataagcagagataacgcgaagaactctctctacctcaaatgaactctctgcccggctgaagatacagctgtgtatt
attgccccgcccgggtataacaattactactctgataattggggccaagggacaaccgtaaccgtgtctagcgttcaactaag
ggtccaagcgtgtccctttggcaccctgcagcagaagcagctccgagctacccgtgcttgggctgtctctcaaggactactt
ccccgaaccagttactgtttcttggaaactctggtgcactcacaagtggtggtccatacgttccccggcttttgaatccagcgggtt
gtactcttttaccgtggtcactgttctagctccagcctcggcactaaaacttactgtaatgtagaccataagcccagcaac
accaaggtggataagagagctcaggtccaagtagccctctgtctccatgtctgcccggaggccggaggaccttct
gtgtccttttccacaaaactaaagacacccttatgatatcccgaactcccaggtaacgtgctggtgtagtcatgtaagccag
gaagatcccgaagtcagttcaattggtacgttgacggcgtcgaagtcacaatgtaagacaaaaccagggaagagcagctc
aacagcacctatcgcgtagtgagcgtactgacctgtcccaagactggctcaacggtaaggaatataaatgtaaggttcca
ataaaggcctgccagctcaattgagaaaactatccaaagctaaaggggcaacctcgagaaccacaggtttacacacttctctc
atcacaggaggaaatgacgaaaaatcaggttagcctgactgtctcgttaaaggatttatccatctgatattgccgtagaatggga
gagtaatggacagcctgagaataactataagaccacaccctcctcactctgacggctcattcttctgtattctcgttgc
ggtggacaagagcagatggcaggaagggaacgtgtttctgacgtgtgatgcacagggcactgcataatcattacacacagaa
gtctttgtccctgtcactgggtggcggaggaggtcaggaggtggggcagtgggcgggaggtcacaggtccagcttgc
agtctgggagaggtgaagaagcccgggagtagtgaaggtcagctgtaaggcgtcaggtacgctttactaataactacat
tgaatgggtgagacaggtccaggccaggtgtctttagtggtggcgtgattaatcaggctggggtgacactaatacaatgag
aagttcaaaggcgggtgactatcacggcagataagtctacttccactgcttatatggagctcctccctgaggagcgaagaca
ccgctgtttattattgtcccggcgagatacagccatgggtattatgccctcgtatccatggggccagggcacgacagttaccgtg
agctccggaggagggaggcggggggcgggggatctggaggaggagggaagtgagggtggagggtctggggggaggcgg
aagcgatatccagatgactcaaaccttagtctctgagcgcctctgtggcgacagagtacaataacctgtaagcatcacia
aacgtggcaccaacgtggcgtggtatcaacaaaactggcaaggcgcctaagttgctgattatagtgcatcttacaggtattc
aggggtgcccctcagatttagtgagcgtggcagcggaaaccgattcactctcacaataagctcttccagcagaggacttgcg
acgtattattccaacagattgggactatccactgacttctggttggaaacaaggttgagatcaag

SEQ ID NO: 4 - Seq. de ADN que codifica que codifica el segundo polipéptido ejemplificado (SEQ ID NO.2) y un péptido señal

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggatccactggtgaaattgtgtgacacagctccagc
cacctgtcttctccaggggaaagagccacctctcctgccacgccagcagcagattagcaacagcctactggtaccaa
cagaaacctggcaggctcccaggctcctcatctattatgtagacagctccatccaggcatccagccaggttcagtgccagtg
ggtctgggacagactcactctccatcagcagcctagagcctgaagatttgcagtttactgtcaacagagtgagagctgg
ccgctccactcggcggagggaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatctcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgctctgtgtgctcctgtaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggat
aacgccctccaatcgggtaactcccaggagaggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacc
ctgacgctgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgctcggaaagtcaccatcagggcctgagctcggccgtca
caaagagcttcaacaggggagagtg

5

SEQ ID NO: 5 - HCVR1 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGG
GFGTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGYNNYYFDI
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 6 - HCVR2 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFTNYYIEWVRQAPGQCLEWMGVINP
GWGDTNYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRDTAHGYY
ALDPWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 7 - LCVR1 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

5 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASDSISNSLHWYQQKPGQAPRLLIYYARQSIQG
IPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQSESWPLHFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 8 - LCVR2 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYR
YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYWDYPLTFGCGTKVEIK

SEQ ID NO: 9 - HCDR1 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

AASGFTFSSYTMS

10 **SEQ ID NO: 10 - HCDR2 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)**

TISGGGFGTYYPDSVKG

SEQ ID NO: 11 - HCDR3 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

ARPGYNNYYFDI

SEQ ID NO: 12 - HCDR4 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

15 KASGYAFTNYYIE

SEQ ID NO: 13 - HCDR5 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

VINPGWGDNYNEKFKG

SEQ ID NO: 14 - HCDR6 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

ARRDTAHGYYALDP

20 **SEQ ID NO: 15 - LCDR1 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)**

HASDSISNSLH

SEQ ID NO: 16 - LCDR2 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

YYARQSIQ

SEQ ID NO: 17 - LCDR3 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

25 QQSESWPLH

SEQ ID NO: 18 - LCDR4 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

KASQNVGTNVA

SEQ ID NO: 19 - LCDR5 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)

YSASYRYS

30 **SEQ ID NO: 20 - LCDR6 ejemplificado (de compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1)**

QQYWDYPLT

SEQ ID NO: 21 - L1 ejemplificado del compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1

GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 22 - L2 ejemplificado del compuesto de anticuerpo biespecifico ejemplificado de la Tabla 1

5 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

Listado de secuencias

<110> Eli Lilly and Company

<120> COMPUESTOS DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-DKK-1-ANTI-RANKL

<130> X20730

10 <150> 62/163,044

<151> 2015-05-15

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 713

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de primer polipéptido ejemplificado

20 <400> 1

ES 2 755 031 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Phe Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Pro Gly Tyr Asn Asn Tyr Tyr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

ES 2 755 031 T3

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

ES 2 755 031 T3

				405					410							415
Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
			420					425					430			
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	
		435					440					445				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	
	450					455					460					
Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	
465					470					475					480	
Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Asn	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Trp	
				485					490					495		
Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Cys	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Val	Ile	Asn	
			500					505					510			
Pro	Gly	Trp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	
		515					520					525				
Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	
	530					535					540					
Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Asp	
545					550				555						560	
Thr	Ala	His	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	
				565					570					575		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
			580				585						590			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	
		595					600						605			
Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	
	610					615					620					
Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Asn	Val	Ala	
625					630					635					640	
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	
				645					650					655		

ES 2 755 031 T3

Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 660 665 670

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 675 680 685

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Asp Tyr Pro Leu Thr Phe
 690 695 700

Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 705 710

<210> 2

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de segundo polipéptido ejemplificado

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys His Ala Ser Asp Ser Ile Ser Asn Ser
 20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Arg Gln Ser Ile Gln Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

His Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

ES 2 755 031 T3

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 3

<211> 2199

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de ADN que codifica el primer polipéptido ejemplificado con un péptido señal

<400> 3

```

atggagacgg acactctcct cctgtgggta ttgctcctt gggccctggt ttctacaggg      60
gaggtacagc tggtagaaag cgggtgggga ttggtacaac caggtggatc tctccggttg      120
tcatgtgcag ctagtggggt taccttctcc agttatacga tgtcttgggt gagacaagcg      180
cccggtaaag gattggagtg ggtcgcaacc atcagtggag gagggtttg aacatactac      240
cctgatagcg ttaaggggcg gtttaccata agcagagata acgcgaagaa ctctctctac      300
cttcaaata ga actctctgcg ggctgaagat acagctgtgt attattgcbc ccgcccctggg      360
tataacaatt actacttcga tatttggggc caagggacaa ccgtaaccgt gtctagcgcg      420
tcaactaagg gtccaagcgt gttccctttg gcaccctgca gcagaagcac gtccgagtct      480
accgctgctt tgggctgtct cgtcaaggac tacttccccg aaccagttac tgtttcttgg      540
aactctggtg cactcacaag tgggggtccat acgttccccg ccgttttgca atccagcggg      600
ttgtactctc ttcatccgt ggtcactggt cctagctcca gcctcggcac taaaacttac      660
acttgtaatg tagaccataa gccagcaac accaagggtg ataagagagt cgagtccaag      720
tacggccctc cttgtcctcc atgtcctgcg ccggaggccg ccggaggacc ttctgtgttc      780
cttttccac caaacctaa agacaccctt atgatatccc gaactccoga ggtaactgac      840
gtggtagtcg atgtaagcca ggaagatccc gaagtccagt tcaattggta cgttgacggc      900
gtcgaagtcc acaatgctaa gacaaaaccc aggaagagc agttcaacag cacctatcgc      960
gtagtgagcg tactgaccgt gcttcaccaa gactggctca acggttaagga atataaatgt     1020
    
```

ES 2 755 031 T3

aaggtttcca ataaaggcct gccagctca attgagaaaa ccatatccaa agctaagggg 1080
 caacctcgag aaccacaggt ttacacactt cctccatcac aggaggaaat gacgaaaaat 1140
 caggtagcc tgacttgtct cgtaaagga tttatccat ctgatattgc cgtagaatgg 1200
 gagagtaatg gacagcctga gaataactat aagaccacac caccctctct cgactctgac 1260
 ggctcattct tcctgtattc tcgcttgacg gtggacaaga gcagatggca ggaagggaac 1320
 gtgttttctt gcagtgtgat gcacgaggca ctgcataatc attacacaca gaagtctttg 1380
 tcctgtcac tgggtggcgg aggaggttca ggagtgggg gcagtggcgg cggaggctca 1440
 caggccagc ttgtccagtc tggggcagag gtgaagaagc ccgggagtag tgtgaaggtc 1500
 agctgtaagg cgtcagggtc cgcttttact aattactaca ttgaatgggt gagacaggct 1560
 ccaggccagt gtcttgagt gatggcgtg attaataccag gctggggtga cactaattac 1620
 aatgagaagt tcaaagggcg ggtgactatc acggcagata agtctacttc cactgcttat 1680
 atggagctct cctccctgag gagcgaagac accgctgttt attattgtgc ccggcgagat 1740
 acagcccatg ggtattatgc cctcgatcca tggggccagg gcacgacagt taccgtgagc 1800
 tccggaggag gagggagcgg gggcggggga tctggaggag gaggaagtgg agtgaggagg 1860
 tctgggggag gcggaagcga tatccagatg actcaaagcc ctagtctctt gagcgcctct 1920
 gtgggcgaca gagtgacaat aacctgtaa gcatcacaaa acgtgggcac caactggcgg 1980
 tggatcaac aaaaacctgg caagcgcct aagttgctga tttatagtgc atcttacagg 2040
 tattcagggg tgccctccag atttagtggc agtggcagcg gaaccgattt cactctcaca 2100
 ataagctctc ttcagccaga ggacttcgcg acgtattatt gccaacagta ttgggactat 2160
 ccactgactt tcggttgtgg aacaaagggt gagatcaag 2199

<210> 4

<211> 702

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de ADN que codifica el segundo polipéptido ejemplificado con un péptido señal

<400> 4

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atccactggt 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgcc acgccagcga cagtattagc aacagcctac actggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctattat gctagacagt ccatccaggg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcaacag agtgagagct ggccgctcca cttcggcgga 360

ES 2 755 031 T3

gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgtgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 702

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de HCVR1 ejemplificado

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Pro Gly Tyr Asn Asn Tyr Tyr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> constructo sintético de HCVR2 ejemplificado

<400> 6

ES 2 755 031 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Trp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asp Thr Ala His Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Pro Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de LCVR1 ejemplificado

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys His Ala Ser Asp Ser Ile Ser Asn Ser
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Arg Gln Ser Ile Gln Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

His Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> constructo sintético de LCVR2 ejemplificado

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Asp Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de HCDR1 ejemplificado

<400> 9

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
15 1 5 10

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> constructo sintético de HCDR2 ejemplificado

<400> 10

ES 2 755 031 T3

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Phe Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de HCDR3 ejemplificado

<400> 11

Ala Arg Pro Gly Tyr Asn Asn Tyr Tyr Phe Asp Ile
 1 5 10

10 <210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> constructo sintético de HCDR4 ejemplificado

<400> 12

Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Tyr Ile Glu
 1 5 10

<210> 13

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de HCDR5 ejemplificado

<400> 13

Val Ile Asn Pro Gly Trp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

25 Gly

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> constructo sintético de HCDR6 ejemplificado

<400> 14

Ala Arg Arg Asp Thr Ala His Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Pro
 1 5 10

<210> 15

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de LCDR1 ejemplificado

<400> 15

10 His Ala Ser Asp Ser Ile Ser Asn Ser Leu His
 1 5 10

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> constructo sintético de LCDR2 ejemplificado

<400> 16

Tyr Tyr Ala Arg Gln Ser Ile Gln
 1 5

<210> 17

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de LCDR3 ejemplificado

25 <400> 17

Gln Gln Ser Glu Ser Trp Pro Leu His
 1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> constructo sintético de LCDR4 ejemplificado

<400> 18

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> constructo sintético de LCDR5 ejemplificado
 <400> 19
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 20
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético de LCDR6

15 <400> 20
Gln Gln Tyr Trp Asp Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> constructo sintético de L1 ejemplificado
 <400> 21
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

25 <210> 22
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

30 <223> constructo sintético de L2 ejemplificado
 <400> 22
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de anticuerpo biespecífico que comprende dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos en el que cada una de,

5 a.) dicha primera cadena de polipéptidos comprende un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) y una cadena pesada (HC) de mAb IgG, la HC tiene una región variable de cadena pesada (HCVR1) que comprende CDRs de cadena pesada (HCDR) 1-3 en la que la secuencia de aminoácidos de HCDR1 es SEQ ID NO: 9, la secuencia de aminoácidos de HCDR2 es SEQ ID NO: 10, la secuencia de aminoácidos de HCDR3 es SEQ ID NO: 11, y el scFv que tiene una región variable de cadena pesada (HCVR2) y una
10 región variable de cadena ligera (LCVR2), HCVR2 que comprende HCDRs 4-6 y LCVR2 que comprende LCDR 4-6, en la que la secuencia de aminoácidos de HCDR4 es SEQ ID NO: 12, la secuencia de aminoácidos de HCDR5 es SEQ ID NO: 13, la secuencia de aminoácidos de HCDR6 es SEQ ID NO: 14, la secuencia de aminoácidos de LCDR4 es SEQ ID NO: 18, la secuencia de aminoácidos de LCDR5 es SEQ ID NO: 19, y la secuencia de aminoácidos de LCDR6 es SEQ ID NO : 20; y

15 b.) dicho segundo polipéptido comprende una cadena ligera (LC) de mAb que comprende CDRs de cadena ligera (LCDR) 1-3, en la que la secuencia de aminoácidos de LCDR1 es SEQ ID NO: 15, la secuencia de aminoácidos de LCDR2 es SEQ ID NO: 16, la secuencia de aminoácidos de LCDR3 es SEQ ID NO: 17,

en el que cada scFv está enlazado independientemente a dicha HC a través del enlazador de polipéptido (L1) unido covalentemente al terminal N de HC y al terminal C de LCVR2, y LCVR2 está enlazado a HCVR2 del mismo scFv a través de un segundo enlazador de polipéptido (L2) unido covalentemente al terminal C de LCVR2 y al terminal N de
20 HCVR2.

2. El compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de HCVR1 es SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de LCVR1 es SEQ ID NO: 7, la secuencia de aminoácidos de HCVR2 es SEQ ID NO: 6, y la secuencia de aminoácidos de LCVR2 es SEQ ID NO: 8.

25 3. El compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos de L1 es SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos de L2 es SEQ ID NO: 22.

4. Un compuesto de anticuerpo biespecífico que comprende dos primeras cadenas de polipéptidos y dos segundas cadenas de polipéptidos en el que la secuencia de aminoácidos de cada uno de los primeros polipéptidos es SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cada uno de los segundos polipéptidos es SEQ ID NO: 2.

30 5. Una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, cuya célula es capaz de expresar una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

35 6. Una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, cuya célula es capaz de expresar una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
40

7. Un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en terapia.

8. Un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en terapia de fusión espinal.

45 9. Un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la curación ósea o en el tratamiento de una cualquiera de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco u osteogénesis imperfecta.

50 10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en terapia.

12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 10 o para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en terapia de fusión espinal.

13. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de anticuerpo biespecífico para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en la curación ósea o en el tratamiento de una cualquiera de osteoporosis, osteopenia, espondilolistesis lumbar degenerativa, enfermedad degenerativa del disco u osteogénesis imperfecta.