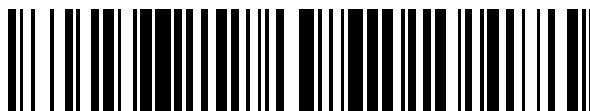


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 869**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2014** **E 17206987 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019** **EP 3312195**

54 Título: **Métodos para tratar la osteogénesis imperfecta**

30 Prioridad:

20.03.2013 US 201361803647 P

09.09.2013 US 201361875399 P

26.09.2013 US 201361883151 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
01.06.2020

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (50.0%)

50 Binney Street

Cambridge, MA 02142, US y

BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (50.0%)

72 Inventor/es:

LEE, BRENDAN y

SAMPATH, KUBER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 763 869 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

Métodos para tratar la osteogénesis imperfecta

SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud se relaciona con la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. n.º 61/803,647, presentada el 20 de marzo de 2013, la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. n.º 61/875,399, presentada el 9 de septiembre de 2013, y la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. n.º 61/883,151, presentada el 26 de octubre de 2013.

FINANCIACIÓN GUBERNAMENTAL

- 10 Esta invención se realizó con apoyo gubernamental a través de P01 HD070394, P01 HD22657 y R01 DE01771, concedidos por el "National Institute of Health". El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

- 15 La presente invención se refiere a métodos para tratar la osteogénesis imperfecta (OI). Más específicamente, la invención se refiere a métodos para tratar la OI usando una proteína de unión, p. ej., un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se una específicamente a factor de crecimiento transformante β humano (TGF β) o a sus isoformas.

ANTECEDENTES

- 20 La osteogénesis imperfecta (OI), también conocida como "enfermedad de huesos de cristal" o síndrome de Lobstein, es una enfermedad ósea congénita, debilitante y rara que afecta a aproximadamente una de cada 15.000 personas. Aunque los fenotipos varían entre los tipos de OI, los síntomas comunes incluyen la osificación incompleta de huesos y dientes, una masa ósea reducida, huesos frágiles y fracturas patológicas. Se cree que dichos síntomas comunes de la OI están causados por mutaciones genéticas que dan como resultado deficiencias en el colágeno de Tipo-I o en otras proteínas implicadas en la deposición de matriz ósea o en la homeostasis. Como resultado de estos síntomas y de la propensión a fracturas y complicaciones óseas fatales, la esperanza de vida de los pacientes de OI es reducida en comparación con la población general. Por consiguiente, claramente existe una necesidad urgente en la técnica para desarrollar tratamientos efectivos de la OI. Mörke *et al.* (1993) *Journal of Orthopaedic Research* 11:564-572 describe reacciones opuestas de células óseas o cultivadas de diferentes pacientes expuestas a TGF β .

- 25 Opsahl *et al.* (2005) *Archives of Oral Biology* 50:279-286 describe que la sobreexpresión de rGF β provoca dentinogénesis imperfecta.

- 30 Edwards *et al.* (2010) *Journal of Bone and Mineral Research* 25:2419-2426 describe el incremento de la masa ósea tras la inhibición de TGF β con el anticuerpo anti-TGF β neutralizante 1 D1 1.

Gebken *et al.* (2000) *Pathobiology* 68:106-112 describe el incremento de la expresión de los receptores para rGF β en osteoblastos de pacientes con OI.

- 35 Seitzer *et al.* (1995) *European Journal of Clinical Investigation* 25:959-966 describe la reducción de las cantidades de TGF β en tejidos óseos de afecciones asociadas con la pérdida ósea y la influencia nula de TGF β 1 sobre los osteoclastos obtenidos de un paciente con osteogénesis imperfecta.

El documento WO2006/086469 describe moléculas de tipo anticuerpo que se unen a TGF β .

Glorieux (2007) *Pediatrics* 119 suppl.1:S163-S165 describe el tratamiento de la osteogénesis imperfecta con bisfosfonatos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A (ensayos Western blot) y 1B-1F (gráficos): demuestran que la señalización de TGF β es elevada en huesos de ratones Crtp $^{-/-}$, en comparación con los controles naturales.

Figuras 2A (imagen luminiscente) y 2B-C (gráficos): muestran que los ratones Crtp $^{-/-}$ cruzados con ratones indicadores de TGF β exhiben una mayor actividad de TGF β que los controles naturales.

- 45 Figura 3: es un imagen de μ CT de vértebras de ratones Crtp $^{-/-}$ tratados con el anticuerpo 1D11 anti-TGF β pan-específico.

Figura 4: es un gráfico que contiene medidas cuantitativas de vértebras de ratones Crtp $^{-/-}$ tratados con el anticuerpo 1D11 anti-TGF β pan-específico.

Figura 5: es un análisis histomorfométrico de vértebras de ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con el anticuerpo 1D11 anti-TGFβ pan-específico.

Figura 6A y 6B: son gráficos que demuestran las propiedades biomecánicas (Figura 6A – carga máxima, y Figura 6B – rigidez) de fémures de ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con el anticuerpo 1D11 anti-TGFβ pan-específico, determinadas mediante un ensayo de doblamiento de tres puntos.

Figura 7A y 7B (imágenes de micrografías) y 7C (gráfico): demuestran el fenotipo pulmonar de ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con el anticuerpo 1D11 anti-TGFβ pan-específico.

Figura 8: son imágenes de micrografía de pulmones de *Crtpap^{-/-}* y naturales con un anticuerpo anti-decorina.

Figura 9: es un gráfico que muestra un ensayo de unión a decorina.

Figura 10: es un grupo de gráficos, fotos e imágenes que demuestran un aumento de la señalización de TGFβ en ratones *Crtpap^{-/-}*. Figura 10A: es una serie de tres gráficos que muestran los resultados de RT-PCR cuantitativa de los genes diana de TGFβ p21, PAI-1 y Col1a1. Los gráficos indican un incremento de la señalización de TGFβ en hueso calvaria de ratones P3 WT y *Crtpap^{-/-}*. Los resultados se muestran como tasa de cambio del media del grupo WT ± SD; n=5 por grupo, *p<0,05. Figura 10B: es una fotografía de un análisis Western blot de extractos de proteína de calvaria P3, que muestra un aumento de la cantidad de Smad2 activada (pSmad2) respecto a la proteína Smad2 total en ratones *Crtpap^{-/-}* frente a ratones WT, lo que sugiere un aumento de la señalización de TGFβ; n=3 por grupo. Figura 10C: es un gráfico que muestra la cuantificación del análisis Western blot mostrado en la Figura 10B. Los resultados se muestran como tasa de cambio de la media del grupo WT ± SD, *p<0,05. Figura 10D: es una imagen que muestra un aumento de bioluminiscencia en regiones que solapan con estructuras esqueléticas en ratones *Crtpap^{-/-}* en comparación con ratones WT que fueron intercrucados con ratones indicadores de TGFβ (ratones SBE-Luc). Se muestra una imagen representativa de 3 camadas de P10. En 3 camadas los ratones *Crtpap^{-/-}* muestran una media de 2,86 veces (SD±0,34) la señal de bioluminiscencia en la cabeza/calvaria en comparación con los ratones WT (barra de escala = 1 cm). Figura 10E: es un gráfico que muestra, usando una línea celular indicadora de TGFβ, que la actividad de TGFβ se determinó en medio condicionado procedente de células estromales de médula ósea WT y de *Crtpap^{-/-}* en condiciones osteogénicas durante 3 días, que demuestra una mayor actividad de TGFβ en comparación con el medio procedente de células WT. Los resultados se muestran como tasa de cambio de la media del grupo WT ± SD, n=5 por grupo, *p<0,05. Figura 10F: son dos imágenes que muestran la inmunotinción de pulmones (P10) para pSmad2, que demuestran un aumento de la tinción intracelular en ratones WT y *Crtpap^{-/-}* (aumentos 40X). Se muestran imágenes representativas de n=3 ratones por grupo (barra de escala = 20 μm).

Figura 11: es un grupo de fotos y gráficos que muestran la corrección fenotípica de ratones *Crtpap^{-/-}* tras tratamiento con el anticuerpo 1D11 neutralizante de TGFβ. Figura 11A: es una serie de tres imágenes MicroCT de cuerpos vertebrales L4 de ratones de 16 semanas de edad de tipo natural (WT), *Crtpap^{-/-}* tratados con anticuerpo de control y *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 tras tratamiento durante 8 semanas. Figura 11B: es un grupo de tres gráficos que muestran los resultados de MicroCT de cuerpos vertebrales L4, que demuestran el aumento del volumen óseo/volumen total (BV/TV), del número trabecular (Tb.N) y del espesor trabecular (Tb.Th) en ratones WT, *Crtpap^{-/-}* de control y *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11. Los resultados se muestran como las medias ±SD, n=8 por grupo, *p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* 1D11 vs. *Crtpap^{-/-}* de control, +p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* vs. WT. Figura 11C: es un grupo de tres gráficos que muestran los resultados del análisis histomorfométrico de vértebras L4, que demuestra un aumento del número de osteoclastos (N.Oc/BS) y de osteoblastos (N.Ob/BS) por superficie de hueso en ratones *Crtpap^{-/-}* en comparación con WT. Una reducción del número de osteoblastos y osteoclastos tras tratamiento con 1D11 indica una supresión efectiva de la remodelación ósea acelerada en ratones *Crtpap^{-/-}*. El aumento del número de osteocitos por área de hueso (N.Ot/B.Ar) en ratones *Crtpap^{-/-}* se reduce al nivel de WT tras tratamiento con 1D11. Los resultados se muestran como medias ± SD, n=6 por grupo, *p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* 1D11 vs. *Crtpap^{-/-}* de control, +p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* vs. WT. Figura 11D: es una serie de tres imágenes que muestran la tinción de hematoxilina/eosina de pulmones inflados de ratones de 16 semanas de edad de tipo natural (WT), ratones *Crtpap^{-/-}* de control y ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 tras tratamiento durante 8 semanas. Los ratones *Crtpap^{-/-}* de control muestran un aumento en el espacio aéreo distal en comparación con los ratones WT. Tras el tratamiento con 1D11, existe una reducción en el diámetro aéreo distal en comparación con los ratones *Crtpap^{-/-}* de control. Se muestran imágenes representativas de n=8 ratones por grupo (barra de escala = 100 μm). Figura 11E: es un gráfico que muestra la cuantificación de la distancia entre las estructuras alveolares mediante el método de media-lineal-intercepción (MLI), que demuestra una reducción significativa del espacio aéreo distal en ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 en comparación con ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con anticuerpo de control y ratones WT. Los resultados se muestran como medias ± SD, n=8 ratones por grupo, 10 imágenes analizadas por ratón, *p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* 1D11 vs. *Crtpap^{-/-}* de control, +p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* vs. WT.

Figura 12: es una serie de gráficos que muestra que la unión de decorina a colágeno de tipo I solapa el sitio P986 3Hyp y está reducida en el colágeno de tipo I de ratones *Crtpap^{-/-}*. Figura 12A: es un grupo de tres gráficos que muestran los resultados de RT-PCR cuantitativa de hueso calvaria de ratones P3, que no muestra diferencias en la expresión de ARN de los proteoglicanos ricos en leucina pequeños decorina (Dcn), biglicano (Bgn) y asporina (Aspn) en hueso calvaria de ratones *Crtpap^{-/-}* en comparación con ratones WT. Los resultados se presentan como tasa de cambio de la media del grupo WT ± SD, n=5 por grupo. Figura 12B: es un gráfico que muestra los resultados de

análisis de resonancia de plasmón superficial que indica que la unión de proteína de núcleo de decorina recombinante a colágeno de tipo I de ratones *Crtpap^{-/-}* es aproximadamente un 45% menor que a colágeno de tipo I de ratones WT. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes usando decorina 3, 5 y 12 μ M. Se muestran las unidades de respuesta (RU) de la cantidad total de decorina unida normalizada al colágeno de tipo I inmovilizado sobre el chip. La reducción media de la unión de decorina a colágeno de tipo I de *Crtpap^{-/-}* es de $44,6 \pm 7,9\%$.

Figura 13: es una serie de gráficos y fotos que muestran que la inhibición del aumento de la señalización de TGF β mejora el fenotipo óseo en un modelo de ratón de OI dominante que procede de una mutación G610C en el gen *Col1a2* (*Col1a2^{tm1.1Mcbr}*). Figura 13A: son dos gráficos que muestran los resultados de RT-PCR cuantitativa de los genes diana de TGF β p21 y PAI-1, que indica un aumento de la señalización de TGF β en hueso calvaria de ratones WT P3 y *Col1a2^{tm1.1Mcbr}*. Los resultados se muestran como tasa de cambio de la media del grupo WT $\pm$ SD; n=3 por grupo, *p<0,05. Figura 13B: es una foto de los resultados de los análisis Western blot, que muestra un aumento de los niveles de Smad2 activado (pSmad2) respecto a los niveles totales de proteína Smad2 en calvaria P3 de ratones WT y *Col1a2^{tm1.1Mcbr}* en comparación con WT, lo que sugiere un aumento de la señalización de TGF β ; n=3 por grupo. Figura 13C: es un gráfico que muestra la cuantificación del Western blot observado en la Figura 13B. Los resultados se muestran como tasa de cambio de la media del grupo WT $\pm$ SD; *p<0,05. Figura 13D: son una serie de fotos de imágenes MicroCT de cuerpos vertebrales L4 de ratones de 16 semanas de edad de tipo natural (WT), ratones *Col1a2^{tm1.1Mcbr}* tratados con anticuerpo de control y ratones *Col1a2^{tm1.1Mcbr}* tratados con 1D11 tras tratamiento durante 8 semanas. Figura 13E: es una serie de gráficos de datos procedentes de MicroCT de cuerpos vertebrales L4, que muestra un aumento del volumen óseo/volumen total (BV/TV), del número trabecular (Tb.N) y del espesor trabecular (Tb.Th) en ratones *Col1a2^{tm1.1Mcbr}* tras tratamiento con 1D11. Los resultados se muestran como medias $\pm$ SD, n=6 por grupo, *p<0,05 para *Col1a2^{tm1.1Mcbr}* 1D11 vs. *Col1a2^{tm1.1Mcbr}* de control, +p<0,05 para *Col1a2^{tm1.1Mcbr}* vs WT.

Figura 14: es un gráfico de curva de peso, que muestra una reducción de peso en ratones *Crtpap^{-/-}* en comparación con ratones WT durante el periodo de estudio (p<0,05 para todos los tiempos, se muestran las medias $\pm$ SD). No se observó una diferencia estadísticamente significativa en peso en los ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 en comparación con los ratones *Crtpap^{-/-}* de control.

Figura 15: son una serie de gráficos y tablas que no muestran ningún efecto de la inhibición de TGF β sobre la modificación post-traducciona de colágeno de tipo I anormal en ratones *Crtpap^{-/-}*. Figura 15A: es una serie de tres gráficos que muestran espectros de masas en tándem de colágenos de tipo I extraídos de tibias de ratones WT, ratones *Crtpap^{-/-}* de control y ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 (ratones de 16 semanas de edad, tras tratamiento durante 8 semanas). La secuencia del gráfico superior es la SEQ ID NO: 19, la secuencia del gráfico del medio es la SEQ ID NO: 20 y la secuencia del gráfico inferior es la SEQ ID NO: 21. Figura 15B: es una tabla que muestra un resumen de análisis de espectros de masas en tándem. El tratamiento con 1D11 no afectó de forma significativa al estatus de 3-hidroxilación del residuo de colágeno Pro986 alfa 1 (I) en muestras óseas. Se muestra la media del porcentaje de residuos 3-hidroxilados ($\pm$ SD), n=5 por grupo. Figura 15C: es un grupo de tres gráficos que muestran que el colágeno óseo de tipo I de ratones *Crtpap^{-/-}* de control y ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 exhiben cambios en los niveles de hidroxilisil piridinolina (HP) y de enlaces de lisil piridinolina (LP) y un aumento del ratio HP/LP en comparación con los ratones WT. El tratamiento de 1D11 en ratones *Crtpap^{-/-}* no afectó de forma significativa a estos parámetros, en comparación con los ratones *Crtpap^{-/-}* de control. Los resultados se muestran como medias $\pm$ SD, n=4 ratones por grupo, +p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* vs. WT.

Figura 16: es una serie de gráficos que muestra los marcadores de recambio de suero óseo osteocalcina (OCN) y el telopeptido reticulado C-terminal de colágeno óseo (CTX) al inicio (Figura 16A = 8 semanas de edad) y al final del estudio de tratamiento (Figura 16B = 16 semanas de edad). Figura 16A: son dos gráficos que muestran que un aumento de los niveles en suero de OCN y CTX en ratones *Crtpap^{-/-}* de 8 semanas de edad en comparación con ratones WT al inicio del estudio aumentó la frecuencia de recambio óseo en ratones *Crtpap^{-/-}*. Los resultados se dan como medias $\pm$ SD, n=8 para WT, n=14 para ratones *Crtpap^{-/-}*, +p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* vs. WT. Figura 16B: son dos gráficos que muestran que a las 16 semanas de edad los ratones *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 presentan una tendencia a la reducción de OCN en suero y niveles de CTX en suero significativamente reducidos en comparación con los ratones *Crtpap^{-/-}* de control, lo que indica una supresión del aumento de la frecuencia de recambio por inhibición de TGF β . Los resultados se dan como medias $\pm$ SDs, n=8 para WT, n=7 para el grupo *Crtpap^{-/-}*; *p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* 1D11 vs. *Crtpap^{-/-}* de control, +p<0,05 para *Crtpap^{-/-}* vs. WT.

Figura 17: es una tabla que muestra los resultados de análisis de MicroCT de cuerpos vertebrales L4 de ratones WT, *Crtpap^{-/-}* de control y *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 (ratones de 16 semanas de edad, tras tratamiento durante 8 semanas). Se muestran las medias $\pm$ SD para el volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV), el número trabecular (Tb.N), el espesor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp) y la densidad mineral ósea de volumen óseo (BMD BV); n=8 por grupo, + indica ANOVA unidireccional Kruskal-Wallis en rangos en los que el test de varianzas iguales falló. n.s. = no significativo estadísticamente.

Figura 18: es una tabla que muestra los resultados de análisis de MicroCT de hueso trabecular en fémures proximales correspondientes a ratones WT, *Crtpap^{-/-}* de control y *Crtpap^{-/-}* tratados con 1D11 (ratones de 16 semanas de edad, tras tratamiento durante 8 semanas). Se muestran las medias $\pm$ SD para el volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV), el número trabecular (Tb.N), el espesor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp) y la

densidad mineral ósea de volumen óseo (BMD BV); n=8 por grupo. + indica ANOVA unidireccional Kruskal-Wallis en rangos en los que el test de varianzas iguales falló. n.s. = no significativo estadísticamente.

Figura 19: es una tabla que muestra los resultados de análisis de MicroCT de hueso cortical de mitad del fémur correspondientes a ratones WT, Crtap^{-/-} de control y Crtap^{-/-} tratados con 1D11 (ratones de 16 semanas de edad, tras tratamiento durante 8 semanas). Se muestran las medias $\pm$ SD para el espesor cortical, la densidad mineral ósea de volumen óseo (BMD BV), el diámetro anterior-posterior (a.p.), el área transversal (CSA) y los momentos de inercia transversales (CSMI) para el eje medio-lateral (m.l.) y anterior-posterior (a.p.); n=8 por grupo. n.s. = no significativo estadísticamente.

Figura 20: es una tabla que muestra los resultados del ensayo biomecánico de fémures por torsión de 3 puntos (ratones de 16 semanas de edad, tras tratamiento durante 8 semanas). En comparación con los ratones WT, los ratones Crtap^{-/-} de control exhiben unos parámetros biomecánicos significativamente reducidos, excepto el módulo elástico y el desplazamiento elástico. El tratamiento anti-TGF β con 1D11 dio como resultado mejoras significativas de la carga máxima y la resistencia definitiva en fémures Crtap^{-/-}, lo que indica un aumento de hueso completo y de resistencia tisular. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el desplazamiento post-rendimiento, lo que indica que el 1D11 no afectó al aumento de fragilidad del hueso Ol. n=6 para ratones WT, n=4 para ratones Crtap^{-/-} y n=3 para ratones Crtap^{-/-} tratados con 1D11. n.s. = no significativo estadísticamente.

Figura 21: es una tabla que muestra los resultados de análisis histomorfométricos de cuerpos vertebrales L4 de ratones WT, ratones Crtap^{-/-} de control y ratones Crtap^{-/-} tratados con 1D11 (ratones de 16 semanas de edad, tras tratamiento durante 8 semanas). Se muestran las medias $\pm$ SD para el volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV), el número trabecular (Tb.N), el espesor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp), el número de osteoclastos/superficie ósea (N.Oc/BS), la superficie de osteoclastos/superficie ósea (Oc.S/BS), el número de osteoblastos/superficie ósea (N.Ob/BS), la superficie de osteoblastos/superficie ósea (Oc.S/BS) y el número de osteocitos/área ósea (N.Ot/B.Ar); n=6 por grupo. + indica ANOVA unidireccional Kruskal-Wallis en rangos en los que el test de varianzas iguales falló. n.s. = no significativo estadísticamente.

Figura 22: es una tabla que muestra los resultados de análisis de MicroCT de cuerpos vertebrales L4 de ratones WT, Col1 α 2^{tm1.1Mcb} de control y Col1 α 2^{tm1.1Mcb} tratados con 1D11 (ratones de 16 semanas de edad, tras tratamiento durante 8 semanas). Se muestran las medias $\pm$ SD para el volumen óseo/volumen de tejido (BV/TV), el número trabecular (Tb.N), el espesor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp) y la densidad mineral ósea de volumen óseo (BMD BV); n=6 por grupo. n.s. = no significativo estadísticamente.

Figura 23: es un gráfico que muestra el análisis de resonancia de plasmón superficial que mide la unión de proteína de núcleo decorina recombinante a colágeno de tipo I de ratones WT y Crtap^{-/-}. Se realizaron tres réplicas técnicas a cada una de las concentraciones de decorina indicadas a partir de dos réplicas biológicas independientes ($\blacklozenge$ réplica 1, $\blacktriangle$ réplica 2). Los resultados se muestran como porcentaje de la media de WT (las barras indican la media por grupo).

Figura 24: (imágenes de micrografías) demuestra la inmunotinción correspondiente a decorina en la metáfisis de fémur distal de ratones WT y Crtap^{-/-} a 20X, n=3 por genotipo, barras de escala=100 μ m (Figuras 24A-24C) y 40X de aumento, n=3 por genotipo, barras de escala = 50 μ m (Figuras 24D-24F). Los fémures de control fueron incubados solo en anticuerpo secundario.

Figura 25: (imágenes de micrografías) demuestra la inmunotinción correspondiente a TGF β 1 en la metáfisis de fémur distal de ratones WT y Crtap^{-/-} a 20X, n=3 por genotipo, barras de escala=100 μ m (Figuras 25A-25C) y 40X de aumento, n=3 por genotipo, barras de escala = 50 μ m (Figuras 25D-25F). Los fémures de control fueron incubados solo en anticuerpo secundario.

Figura 26: (imágenes de micrografías) demuestra la inmunotinción correspondiente a TGF β 1 en la metáfisis de fémur distal de ratones WT y Col1 α 2^{tm1.1Mcb} a 20X, n=3 por genotipo, barras de escala=100 μ m (Figuras 26A-26C) y 40X de aumento, n=3 por genotipo, barras de escala = 50 μ m (Figuras 26D-26F). Los fémures de control fueron incubados solo en anticuerpo secundario.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a, y neutraliza, TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 para uso en un método para tratar la osteogénesis imperfecta (OI) en un sujeto humano que lo necesita en combinación con un bisfosfonato, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a, y neutraliza, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 para uso en un método para tratar la osteogénesis imperfecta (OI) en un sujeto humano que lo necesita en combinación con teriparatide,

donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

La presente divulgación describe métodos para tratar de forma efectiva la osteogénesis imperfecta (OI). Más específicamente, la divulgación describe métodos para tratar la OI utilizando una proteína de unión tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) o una isoforma del mismo. Preferentemente, la proteína de unión es "pan-específica" y se une a las tres isoformas humanas de TGFβ, es decir, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3. Más preferiblemente, la proteína de unión se une específicamente a, y neutraliza, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humanos. En un aspecto, la divulgación describe un método para tratar la OI en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TGFβ.

En una divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR, del inglés "Complementarity Determining Regions") que presentan secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 4, 5 y 6; y una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR que presentan secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 7, 8 y 9.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En un ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende además una región constante de IgG4 humana. En un ejemplo, la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo además comprenden una región constante de cadena ligera κ humana. En otro ejemplo, la región constante de cadena ligera κ humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo además comprende una región constante de IgG4 humana y una región constante de cadena ligera κ humana.

En otro ejemplo, la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y la región constante de cadena ligera κ humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En otro ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14. En otro ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En otro ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humanos. En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo neutraliza TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 humanos.

En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mejora un parámetro óseo seleccionado del grupo que consiste en densidad volumétrica ósea (BV/TV), superficie ósea total (BS), densidad superficial ósea (BS/BV), número trabecular (Tb.N), espesor trabecular (Tb.Th), espaciado trabecular (Tb.Sp), y volumen total (Dens TV).

En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhiben la resorción ósea.

En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce un biomarcador en suero de la resorción ósea seleccionado del grupo que consiste en hidroxiprolina urinaria, piridinolina (PYD) total urinaria, desoxipiridinolina (DPD) libre urinaria, N-telopéptido reticulado (NTX) de colágeno de tipo I urinario, C-telopéptido reticulado (CTX) de colágeno de tipo I urinario o en suero, sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN) y ácido fosfatasa 5b resistente a tartrato (TRAP).

En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo aumenta un biomarcador en suero de la deposición ósea seleccionado del grupo que consiste en fosfatasa alcalina total, fosfatasa alcalina específica de hueso, osteocalcina y pro-colágeno de tipo I (C-terminal/N-terminal).

En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la resorción ósea. En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo promueve la deposición ósea. En otro ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mejora la función de un órgano no esquelético afectado por OI seleccionado del grupo que consiste en función auditiva, función pulmonar y función renal.

En otro aspecto, la divulgación describe un método para tratar la OI en un sujeto que lo necesite que comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unan a TGFβ, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

En otro aspecto, la divulgación describe un método para tratar la OI en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se una a TGFβ en combinación con al menos un agente terapéutico. En otro ejemplo, el agente es un bisfosfonato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado utilizado habitualmente por los especialistas en la técnica.

Cabe destacar aquí que tal como se usan en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” también incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

El término “aproximadamente” significa dentro de un margen del 10%, y más preferiblemente del 5% (ó 1% o menos), de un valor o rango dados.

Los términos “administrar” o “administración” se refieren al acto de inyectar o suministrar físicamente por cualquier otro medio una sustancia tal como existe fuera del organismo (p. ej., un anticuerpo) a un paciente, tal como por administración mucosal, intradérmica, intravenosa, subcutánea, intramuscular y/o cualquier otro método de administración física descrito en la presente memoria o conocido en la técnica. Cuando se trate una enfermedad, o un síntoma de la misma, la administración de la sustancia normalmente se produce tras la aparición de la enfermedad o de sus síntomas. Cuando se quiere prevenir una enfermedad o sus síntomas, la administración de la sustancia se produce normalmente antes de la aparición de la enfermedad o de sus síntomas.

Un “antagonista” o “inhibidor” de TGFβ se refiere a una molécula que es capaz de inhibir o si no de reducir una o más de las actividades biológicas del TGFβ, tal como en una célula que expresa TGFβ o en una célula que expresa un ligando de TGFβ, o que expresa un receptor de TGFβ. En determinados ejemplos de realizaciones, los anticuerpos de la invención son anticuerpos antagonistas que inhiben o si no reducen la actividad de TGFβ en una célula que tiene un receptor de TGFβ expresado en la superficie celular (p. ej., receptor de TGFβ 1, 2 ó 3) cuando dicho anticuerpo es puesto en contacto con dicha célula. En algunas realizaciones, un antagonista de TGFβ (p. ej., un anticuerpo de la invención) puede actuar, por ejemplo, inhibiendo o si no reduciendo la activación y/o los mecanismos de señalización celulares de la célula que expresa un receptor de TGFβ, inhibiendo de este modo una actividad biológica mediada por TGFβ de la célula respecto a la actividad biológica mediada por TGFβ en ausencia de antagonista. En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-TGFβ son anticuerpo anti-TGFβ antagonísticos, preferiblemente anticuerpos anti-TGFβ antagonísticos monoclonales completamente humanos.

Los términos “anticuerpo”, “inmunoglobulina” o “Ig” pueden usarse de forma intercambiable en la presente memoria. El término anticuerpo incluye, aunque sin limitación, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos recombinantemente, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, Fvs de cadena sencilla (scFv) (p. ej., incluyendo monoespecíficos, biespecíficos, etc.), anticuerpos camelizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs ligados a disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, dominios o moléculas de unión a antígeno que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de TGFβ (p. ej., una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-TGFβ). Los anticuerpos anti-TGFβ pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), de cualquier clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o de cualquier subclase (p. ej., IgG2a e IgG2b) de una molécula de inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-TGFβ son humanizados, tal como anticuerpos anti-TGFβ monoclonales humanizados. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-TGFβ son completamente humanos, tal como anticuerpos anti-TGFβ monoclonales completamente humanos. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-TGFβ son anticuerpos IgG, tales como anticuerpos IgG4.

Los términos “composición” y “formulación” pretenden abarcar un producto que contenga ingredientes especificados (p. ej., un anticuerpo anti-TGFβ), opcionalmente en cantidades especificadas, así como cualquier producto que proceda, directa o indirectamente, de la combinación de ingredientes especificados, opcionalmente en cantidades especificadas.

Los términos “región constante” o “dominio constante” se refieren a una porción carboxi terminal de la cadena ligera y pesada que no está implicado directamente en la unión del anticuerpo con el antígeno, pero que exhibe varias funciones efectoras, tal como la interacción con el receptor Fc. Los términos se refieren a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada, y el dominio CHL de la cadena ligera.

El término “epítipo” se refiere a una región localizada sobre la superficie de un antígeno, tal como un polipéptido de TGFβ o un fragmento de polipéptido de TGFβ, que es capaz de ligarse a una o más regiones de unión de antígeno de un anticuerpo, y que presenta actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente en un humano, que es capaz de provocar una respuesta inmune. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido que provoca una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido al cual se une específicamente un anticuerpo, tal como se determina mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, tal como un inmunoensayo. Los epítipos antigénicos no necesitan ser inmunogénicos necesariamente. Los epítipos normalmente constan de agrupamientos moleculares superficiales químicamente activos, tal como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Una región de un polipéptido que contribuye a un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede conformarse a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede ser o no un rasgo superficial tridimensional del antígeno. En determinadas realizaciones, un epítipo de TGFβ es un rasgo superficial tridimensional de un polipéptido de TGFβ (p. ej., en una forma trimérica de un polipéptido de TGFβ). En otras realizaciones, un epítipo de TGFβ es una característica lineal de un polipéptido de TGFβ (p. ej., en una forma dimerica o una forma monomérica del polipéptido de TGFβ). Los anticuerpos anti-TGFβ pueden unirse específicamente a un epítipo de la forma monomérica del TGFβ, a un epítipo de la forma dimerica del TGFβ, o a ambas, la forma monomérica y la forma dimerica del TGFβ.

El término “excipientes” se refiere a sustancias inertes que se usan habitualmente como diluyente, vehículo, conservante, aglomerante, agente estabilizante, etc. para fármacos e incluyen, aunque sin limitación, proteínas (p. ej., albúmina de suero, etc.), aminoácidos (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina, histidina, etc.), ácidos grasos y fosfolípidos (p. ej., alquil sulfonatos, caprilato, etc.), tensioactivos (p. ej., SDS, polisorbato, tensioactivo no iónico, etc.), sacáridos (p. ej., sacarosa, maltosa, trehalosa, etc.) y polioles (p. ej., manitol, sorbitol, etc.). Véase también “Remington’s Pharmaceutical Sciences” (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa.

En el contexto de un péptido o polipéptido, el término “fragmento” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos que la secuencia de aminoácidos completa. Dicho fragmento puede surgir, por ejemplo, de un truncamiento en el extremo amino, un truncamiento en el extremo carboxi y/o una eliminación interna de un residuo(s) de la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos pueden proceder, por ejemplo, de una división de ARN alternativa o de actividad de proteasa in vivo. En determinadas realizaciones, los fragmentos de TGFβ incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 50, al menos 100 residuos de aminoácido, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de TGFβ. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido de TGFβ o un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de TGFβ retiene al menos 1, al menos 2 o al menos 3 funciones del polipéptido o anticuerpo de longitud completa.

Los términos “anticuerpo completamente humano” o “anticuerpo humano” se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable humana y, los más preferiblemente una región constante humana. En realizaciones específicas, los términos se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable y una región constante de origen humano. Los anticuerpos anti-TGFβ “completamente humanos”, en determinadas realizaciones, también pueden abarcar anticuerpos que se unen a polipéptidos de TGFβ y que están codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas que existen de forma natural de una secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización específica, los anticuerpos anti-TGFβ son anticuerpos completamente humanos. El término “anticuerpo completamente humano” incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, tal como describen Kabat et al. (véase Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH N° 91-3242). Los métodos para producir anticuerpos completamente humanos se conocen en la técnica.

La frase “anticuerpo humano recombinante” incluye anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan con medios recombinantes, tal como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedante, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón o una vaca) que es transgénico y/o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique la división de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden presentar regiones variables y constantes derivadas de secuencias de

inmunoglobulina de línea germinal humana (véase Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH N° 91-3242). En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes son sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, cuando se derivan y se relacionan con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio in vivo de línea germinal de anticuerpos humanos.

El término “cadena pesada” cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere a cinco tipos distintos, denominados alfa (α), delta (Δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), en base a la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. Estos tipos distintos de cadenas pesadas son bien conocidos en la técnica y dan lugar a cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, que incluyen cuatro subclases de IgG, a saber IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferiblemente, la cadena pesada es una cadena pesada humana.

Un anticuerpo “aislado” o “purificado” está sustancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular de la cual deriva el anticuerpo, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el anticuerpo está separado de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce recombinantemente. De este modo, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% ó 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en la presente memoria “proteína contaminante”). Cuando el anticuerpo se produce recombinantemente, también está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, 10% ó 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo se produce mediante síntesis química, preferiblemente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separado de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, dichas preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores o compuestos químicos diferentes al anticuerpo de interés. En una realización preferida, los anticuerpos anti-TGF β son aislados o purificados.

Los términos “numeración de Kabat”, y términos similares, son reconocidos en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariable) que otros residuos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH N° 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable habitualmente oscila entre las posiciones de aminoácido 31 a 35 para la CDR1, las posiciones de aminoácido 50 a 65 para la CDR2, y las posiciones de aminoácido 95 a 102 para la CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable habitualmente oscila entre las posiciones de aminoácido 24 a 34 para la CDR1, las posiciones de aminoácido 50 a 56 para la CDR2 y las posiciones de aminoácido 89 a 97 para la CDR3.

El término “cadena ligera” cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere a dos tipos distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera son bien conocidas en la técnica. En las realizaciones preferidas, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

Los términos “manejar”, “que maneja” y “manejo” se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene a partir de una terapia (p. ej., un agente profiláctico o terapéutico), que no da como resultado una cura de la enfermedad o trastorno. En determinadas realizaciones, a un sujeto se le administra una o más terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) para “manejar” una enfermedad mediada por TGF β (p. ej., OI), o uno o más síntomas de la misma, de tal modo que se previene la progresión o el empeoramiento de la enfermedad.

El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos, y cada anticuerpo monoclonal reconocerá típicamente un único epítipo sobre el antígeno. En las realizaciones preferidas, un “anticuerpo monoclonal” es un anticuerpo producido por un único hibridoma u otra célula. El término “monoclonal” no se limita a ningún método particular para preparar el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el método de hibridoma descrito en Kohler et al.; Nature, 256: 495 (1975) o puede aislarse a partir de bibliotecas de fagos. En la técnica se conocen bien otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y anticuerpos monoclonales expresados por las mismas (véase, por ejemplo, el Capítulo 11 de: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª edición.; Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, Nueva York).

El término “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o Estatal o que está incluido en la lista de la Farmacopea de los EE.UU., la Farmacopea Europea u otras Farmacopeas reconocidas de forma general para uso en animales, y más particularmente en humanos.

La expresión “excipiente farmacéuticamente aceptable” significa cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa, tal como un anticuerpo monoclonal, para preparar una forma de dosis cómoda y aceptable. El “excipiente farmacéuticamente aceptable” es un excipiente que es no tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación que comprenden el anticuerpo monoclonal.

Los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se refieren a la inhibición total o parcial del desarrollo, la recurrencia, la aparición o la extensión de una enfermedad mediada por TGFβ y/o los síntomas relacionados con la misma, que resulta de la administración de una terapia o combinación de terapias proporcionadas en la presente memoria (p. ej., una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos).

El término “antígeno de TGFβ” se refiere a la porción de un polipéptido de TGFβ a la cual se une específicamente un anticuerpo. Un antígeno de TGFβ también se refiere a un análogo o derivado de un polipéptido de TGFβ o a un fragmento del mismo al cual se une específicamente un anticuerpo. En algunas realizaciones, un antígeno de TGFβ es un antígeno de TGFβ monomérico o un antígeno de TGFβ dimérico. Una región de un polipéptido de TGFβ que contribuye a un epítipo puede estar constituida por aminoácidos contiguos del polipéptido, o el epítipo puede estar constituido por dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede o no ser un rasgo superficial tridimensional del antígeno. Una región localizada sobre la superficie de un antígeno de TGFβ que es capaz de provocar una respuesta inmune es un epítipo de TGFβ. El epítipo puede o no ser un rasgo superficial tridimensional del antígeno. Tal como se usa en la presente memoria, un “análogo” del antígeno de TGFβ se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a la de un polipéptido de TGFβ, un fragmento de un polipéptido de TGFβ o un epítipo de TGFβ como el descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el análogo puede comprender una secuencia que es idéntica en al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 99%, a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de TGFβ (p. ej., la SEQ ID NO: 1, 2 ó 3), un fragmento de un polipéptido de TGFβ, un epítipo de TGFβ o un anticuerpo anti-TGFβ como el descrito en la presente memoria. Adicional o alternativamente, el polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones de severidad con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de TGFβ, un fragmento de un polipéptido de TGFβ o un epítipo de TGFβ como el descrito en la presente memoria.

Los términos “TGFβ humano”, “hTGFβ” o “polipéptido hTGFβ”, y términos similares, se refieren a los polipéptidos (“polipéptidos”, “péptidos” y “proteínas” se usan de forma intercambiable en la presente memoria) que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, 2 ó 3, y polipéptidos relacionados, que incluyen las variantes SNP de los mismos. Los polipéptidos relacionados incluyen variantes alélicas (p. ej., variantes SNP); variantes de división; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, eliminación e inserción; polipéptidos de fusión; y homólogos interespecies, preferiblemente que retengan la actividad de TGFβ y/o sean suficientes para generar una respuesta inmune anti-TGFβ. También se contemplan formas solubles de TGFβ que sean suficientes para generar una respuesta inmunológica anti-TGFβ. Como apreciarán los especialistas en la técnica, un anticuerpo anti-TGFβ se puede unir a un polipéptido, un fragmento de polipéptido, un antígeno y/o un epítipo de TGFβ, ya que un epítipo es parte de un antígeno más grande, que a su vez es parte del fragmento de polipéptido más grande, que a su vez es parte del polipéptido más grande. El hTGFβ puede existir en forma dimérica o monomérica.

Los términos “enfermedad mediada por TGFβ” y “trastorno mediado por TGFβ” se usan de forma intercambiable y se refieren a cualquier enfermedad o trastorno que esté provocada completa o parcialmente o que sea el resultado de TGFβ, p. ej., hTGFβ. En determinadas realizaciones, el TGFβ se expresa de forma aberrante. En algunas realizaciones, el TGFβ puede estar regulado al alza de forma aberrante en un tipo celular particular. En otras realizaciones, la unión de TGFβ a un receptor de TGFβ provoca una señalización celular normal, aberrante o excesiva. En determinadas realizaciones, el receptor de TGFβ (p. ej., receptor de TGFβ 1, 2 ó 3), se expresa sobre la superficie de una célula, tal como un osteoblasto, un osteoclasto o una célula estromal de médula ósea. En determinadas realizaciones, la enfermedad mediada por TGFβ es una enfermedad ósea degenerativa, tal como la osteogénesis imperfecta.

Las expresiones “se une específicamente” o “que se une específicamente” significan la unión específica a un antígeno o a un fragmento del mismo (p. ej., TGFβ) y que no se une específicamente a otros antígenos. Un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con una menor afinidad, tal como se determina, p. ej., mediante radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), BIACORE, u otros ensayos conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-TGFβ de la invención se puede unir específicamente a TGFβ (p. ej., hTGFβ) con una afinidad de más del doble que un antígeno diferente, no TGFβ. Los anticuerpos o variantes o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno pueden reaccionar de forma cruzada con antígenos relacionados. Por ejemplo, en determinadas realizaciones un anticuerpo anti-TGFβ puede reaccionar de forma cruzada con hTGFβ y otro antígeno de TGFβ (p. ej., un anticuerpo de TGFβ de roedor o de primate no humano). Preferiblemente, los anticuerpos o variantes o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos que no sean TGFβ. Un anticuerpo o una variante o un fragmento del mismo que se unen específicamente a un antígeno de TGFβ pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIACORE, u otras técnicas conocidas por los especialistas en la técnica. Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal de fondo o ruido, y más típicamente de más de 10 veces el fondo. En algunas realizaciones, la proteína o anticuerpo de unión se unirán a su antígeno, p. ej., TGFβ, con una constante de

disociación de entre 1×10^{-6} M y 1×10^{-7} . En otras realizaciones, la constante de disociación se encuentra entre 1×10^{-6} M y 1×10^{-8} . Ver, p. ej., Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology*, segunda edición, Raven Press, Nueva York, en las páginas 332-336 para una discusión relativa a la especificidad de anticuerpos.

Los términos “sujeto” y “paciente” se usan de forma intercambiable. Tal como se usa en la presente memoria, un sujeto es preferiblemente un mamífero, tal como un no primate (p. ej., vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (p. ej., mono y humano), lo más preferiblemente un humano. En una realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano, que padece una enfermedad mediada por TGF β . En otra realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano, que está en riesgo de desarrollar

una enfermedad mediada por TGF β .

El término “agente terapéutico” se refiere a cualquier agente que pueda usarse en el tratamiento, manejo o alivio de una enfermedad mediada por TGF β y/o un síntoma relacionado con la misma. En determinadas realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un anticuerpo de TGF β . En otras determinadas realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un agente diferente de un anticuerpo de TGF β . Preferiblemente, un agente terapéutico es un agente que se conoce por ser útil, o que ha sido usado, o está siendo usado actualmente para el tratamiento, el manejo o el alivio de una enfermedad mediada por TGF β , o uno o más de los síntomas relacionados con la misma.

El término “terapia” se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que pueda usarse en la prevención, el manejo, el tratamiento y/o el alivio de una enfermedad mediada por TGF β (p.ej, OI). En determinadas realizaciones, los términos “terapias” y “terapia” se refieren a una terapia biológica, una terapia de apoyo y/u otras terapias útiles para la prevención, el manejo y el tratamiento y/o alivio de una enfermedad mediada por TGF β conocida por los especialistas en la técnica, tal como el personal médico.

Los términos “tratar”, “tratamiento” y “que trata” se refieren a la reducción o el alivio de la progresión, la gravedad y/o la duración de una enfermedad mediada por TGF β (p. ej., OI) que es el resultado de la administración de una o más terapias (que incluyen, aunque sin limitación, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos). En realizaciones específicas, dichos términos se refieren a la reducción o la inhibición de la unión de TGF β a un receptor de TGF β , la reducción o la inhibición de la producción o la secreción de TGF β desde una célula que expresa un receptor de TGF β de un sujeto, la reducción o la inhibición de la producción o la secreción de TGF β desde una célula que no expresa un receptor de TGF β de un sujeto, y/o la inhibición o la reducción de uno o más síntomas asociados a una enfermedad mediada por TGF β , tal como la OI.

Los términos “región variable” o “dominio variable” se refieren a una porción de las cadenas ligeras y pesadas, típicamente de forma aproximada los 120 a 130 aminoácidos amino-terminales de la cadena pesada y aproximadamente los 100 a 110 aminoácidos de la cadena ligera, que difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y que se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular con su antígeno particular. La variabilidad de secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), mientras que las regiones más altamente conservadas del dominio variable se denominan regiones estructurales (FR, del inglés “framework regions”). Las CDR de las cadenas ligera y pesada son principalmente responsables de la interacción del anticuerpo con el antígeno. La numeración de las posiciones de aminoácido es acorde al Índice EU, tal como en Kabat et al. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Washington D.C.), 5ª edición (“Kabat et al.”). En las realizaciones preferidas, la región variable es una región variable humana.

B. Osteogénesis Imperfecta (OI)

La OI abarca un grupo de trastornos óseos congénitos que se caracterizan por deficiencias en una o más proteínas implicadas en la deposición de matriz ósea u homeostasis. Existen ocho tipos de OI que se definen por su mutación genética específica, y por la deficiencia proteínica y el fenotipo resultantes en el individuo afectado. Aunque los fenotipos varían entre los tipos de OI, los síntomas comunes incluyen una osificación incompleta de huesos y dientes, una masa ósea reducida, huesos frágiles y fracturas patológicas.

El colágeno de tipo-I es una de las proteínas de tejido conectivo más abundantes tanto en tejidos calcificados como no calcificados. Una síntesis precisa, la modificación post-traducciona y la secreción de colágeno de tipo-I son necesarias para un correcto desarrollo, mantenimiento y reparación del tejido. La mayoría de las mutaciones identificadas en individuos con OI dan como resultado una reducción de la síntesis de colágeno de tipo-I, o una síntesis y/o procesado incorrectos del colágeno de tipo I.

Además de las mutaciones del gen de colágeno de tipo I, se han identificado otras mutaciones en genes que participan en el tráfico intracelular y el procesado de colágenos en individuos afectados por OI. Dichos genes incluyen chaperonas moleculares, tales como la proteína 10 de unión a FK506 (FKBP10) y la proteína 47 de choque térmico (HSP47) (Alanay et al., 2010; Christiansen et al., 2010; Kelley et al., 2011). Se han identificado otras mutaciones adicionales en genes reticulantes de colágeno intermolecular, tales como la procolágeno-lisina, la 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2 (PLOD2), y en miembros de la familia de genes de colágeno prolil hidroxilasa, que incluyen proteoglicano enriquecido en leucina prolina (leprecan) (LEPRE1), peptidilpropil isomerasa B (ciclofilina B)

(CYPB), y proteína asociada a cartílago (CRTAP) (Morello et al., 2006; Cabral et al., 2007; Baldridge et al., 2008; van Dijk et al., 2009; Choi et al., 2009; Barnes et al., 2010; Pyott et al., 2011). Aparte de las mutaciones, se cree que proteínas tales como la proteína morfogenética ósea (BMP) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) y sus respectivos receptores, participan en los diversos fenotipos de OI, aunque se desconocen los mecanismos exactos de sus acciones (Gebken et al., 2000).

En una realización, la expresión de TGF β está regulada por moléculas que se unen a colágeno de tipo I y de tipo II. En determinadas realizaciones, un proteoglicano rico en leucina pequeño (SLRP) regula la expresión de TGF β . En una realización específica, la decorina regula la síntesis de TGF β . En una realización determinada, la decorina no se une a colágeno de tipo I o tipo II, en los que el sitio de 3-hidroxiprolina está ausente en la posición 986 de las moléculas de colágeno de tipo I y/o de tipo II.

C. Biología ósea

El esqueleto vertebrado está compuesto de hueso, que es un tejido vivo calcificado que proporciona estructura, soporte, protección y una fuente de minerales para regular el transporte de iones. El hueso es un tejido conectivo especializado que está compuesto por componentes tanto celulares como acelulares. La matriz extracelular (ECM) acelular contiene tanto proteínas de colágeno como proteínas de no colágeno, las cuales participan ambas en el proceso de calcificación. Una ECM correctamente secretada y alineada es crítica para la formación adecuada del hueso. Las patologías aparecen cuando cualquiera de las proteínas de ECM está ausente, malformada o desalineada, tal como se evidencia en la osteogénesis imperfecta.

El término “hueso cortical” o “hueso compacto” se refiere a la capa exterior del hueso, que es densa, rígida y resistente. El término “hueso trabecular” o “hueso canceloso” es la capa esponjosa del interior del hueso, que es más ligera y menos densa que el hueso cortical. El término “trabécula” se refiere a la unidad estructural microscópica del hueso esponjoso, que es una forma de tipo varilla y composición colagenosa.

El hueso es un tejido dinámico que está sometido a una remodelación constante. El término “osteoblasto” se refiere a una célula formadora de hueso terminalmente diferenciada que deposita osteoides. El término “osteóide” se refiere a hueso inmaduro no mineralizado que está compuesto principalmente por colágeno de tipo I. El término “pre-osteoblasto” se refiere a un osteoblasto inmaduro en proliferación que no está totalmente diferenciado. El término “osteoprogenitor” se refiere a una célula pluripotente que da lugar a varios tipos de células estromales, incluyendo los osteoblastos. Las células osteoprogenitoras, que habitualmente se denominan “células madre mesenquimales”, aparecen en la médula ósea y pueden aislarse en número pequeño a partir del torrente sanguíneo. El término “osteoclasto” se refiere a una célula de resorción de hueso terminalmente diferenciada que desciende de un monocito de médula ósea. Los osteoclastos se pueden identificar por su expresión de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP).

En condiciones homeostáticas normales, los osteoblastos y los osteoclastos trabajan al unísono para mantener la integridad ósea. Las patologías aparecen cuando la deposición ósea y la resorción ósea se desacoplan. Por ejemplo, la osteopetrosis es una enfermedad ósea que se caracteriza por un hueso indebidamente denso y duro que es el resultado de osteoclastos que no resorben, mientras que la osteoporosis es un trastorno óseo que se caracteriza por huesos porosos y frágiles que pueden proceder de un aumento de la actividad de osteoclastos. La evidencia sugiere que la actividad de osteoclastos puede verse incrementada en la osteogénesis imperfecta, implicando a este tipo de células como diana potencial para la intervención terapéutica. La presente descripción incluye métodos para inhibir los osteoclastos con un anticuerpo de TGF β .

Se pueden usar varios métodos para medir y caracterizar la estructura, densidad y calidad del hueso, que incluyen la histología y la histomorfometría, la microscopía de fuerza atómica, la microscopía confocal de Raman, la nanoindentación, el test de torsión de tres puntos, imágenes de rayos X y tomografía microcomputarizada (μ -CT). En un ejemplo de realización, los huesos se miden y se caracterizan mediante al menos uno de estos métodos.

El término “densidad de volumen óseo” se refiere a la fracción de un volumen dado de hueso (volumen total o TV) que está compuesta de materia calcificada (volumen óseo o BV). Por tanto, la densidad de volumen óseo se calcula como BV/TV y se presenta como un porcentaje. El término “superficie ósea específica” se refiere a la superficie ósea total (BS) para un volumen dado de hueso. Por tanto, la superficie ósea específica se calcula como BS/TV. Otras medidas óseas habituales incluyen: área ósea (B.Ar), número trabecular (Tb.N); espaciado trabecular (Tb.Sp); N.Oc (número de osteoclasto); Oc.S (área superficial de osteoclasto); Oc.S/BS; número de osteoblasto (N.Ob), área superficial de osteoblasto (Ob.S), perímetro de osteoblasto (Ob.Pm), y derivados de cualquiera de las medidas mencionadas. Un mayor Oc.S/BS es un indicador de un aumento de la resorción ósea por osteoclastos.

D. Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)

Los TGF β son citocinas multifuncionales que están implicadas en la proliferación y diferenciación celular, en el desarrollo embrionario, en la formación de matriz extracelular, en el desarrollo óseo, en la curación de heridas, en la hematopoiesis y en las respuestas inmunes e inflamatorias (Roberts et al., 1981; Border et al., 1995a). La proteína de TGF β secretada se divide en un péptido asociado a latencia (LAP) y un péptido de TGF β maduro, y se encuentra en formas latentes y activas. El péptido de TGF β maduro forma tanto homodímeros como heterodímeros con otros

miembros de la familia de TGF β . El TGF β se puede purificar a partir de cualquier fuente natural, o puede producirse sintéticamente (p. ej., mediante el uso de tecnología de ADN recombinante). Preferiblemente, la molécula de TGF β procede de un humano, lo que se conoce en la presente memoria como "hTGF".

Existen tres isoformas de TGF β humano: TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 (números de acceso Swiss Prot P01137, P08112 y P10600, respectivamente) que, en su estado biológicamente activo, son homodímeros de 25 kDa que comprenden dos monómeros de 112 aminoácidos unidos por un puente de disulfuro inter-cadena. El TGF β 1 difiere del TGF β 2 en 27 cambios de aminoácidos principalmente conservativos, y del TGF β 3 en 22. Estas diferencias han sido mapeadas sobre la estructura 3D del TGF β determinada mediante cristalografía de rayos X (Schlunegger et al., 1992; Peer et al., 1996) y se han definido las regiones de unión a receptor (Griffith et al., 1996; Qian et al., 1996).

hTGF β 1 (SEQ ID NO: 1)

MPPSGLRLLL LLLPLLWLLV LTPGRPAAGL STCKTIDMEL VKRKRIEAI RGQILSKLRLA 60
 SPSPQGEVPP GPLPEAVLAL YNSTRDRVAG ESAEPEPEPE ADYYAKEVTR VLMVETHNEI 120
 YDKFKQSTHS IYMFNTSEL REAVPEPVLL SRAELRLRL KLKVEQHVEL YQKYSNNSWR 180
 YLSNRLLAPS DSPWLSFDV TGVVRQWLSR GGEIEGFRLS AHCSCDSRDN TLQVDINGFT 240
 TGRRGDLATI HGMNRPFLLL MATPLERAQH LQSSRHRRAL DTNYCFSSSTE KNCCVRQLYI 300
 DFRKDLGWKW IHEPKGYHAN FCLGPCPYIW SLDTQYSKVL ALYNQHNPQA SAAPCCVPQA 360
 LEPLPIVYVYV GRKPKVEQLS NMIVRSCKCS 390 (SEQ ID NO: 1)

hTGF β 2 (SEQ ID NO: 2)

MHYCVLSAFL ILHLVTVALS LSTCSTLDMQ QFMRKRIEAI RGQILSKLKL TSPPEDYPEP 60
 EEVPPEVISI YNSTRDLLQE KASRRAAACE RERSDEEYIA KEVYKIDMPP FFPSENAIPP 120
 TFYRPFYRIV RFDVSAMEKN ASNLVKAEFR VFRLQNPKEA VPEQRIELYQ ILKSKDLTSP 180
 TQRYIDSKVV KTRAEGEWLS FVDVDAVHEW LHHKDRNLGF KISLHCPCCF FVPSNNYIIP 240
 NKSEELARF AGIDGTSTYT SGDQKTIKST RKKNSGKTPH LLLMLLPSYR LESQQTNRK 300
 KRALDAAYCF RNVDNCCLR PLYIDFKRDL GWKWIHEPKG YNANFCAGAC PYLWSSDTQH 360
 SRVLSLYNTI NPEASAPCC VSQDLEPLTI LYYIGKTPKI EQLSNMIVKS CKCS 414 (SEQ ID NO: 2)

hTGF β 3 (SEQ ID NO: 3)

MKMHQLRALV VLALLNFATV SLSTCTTTL DFGHIKKKRV EAIRGQILSK LRLTSPPEPT 60
 VMTHVPYQVL ALYNSTRELL EEMHGEREEG CTQENTESEY YAKEIHKFDM IQGLAEHNEL 120
 AVCPKGITSK VFRFNVSSVE KNRTNLFRAE FRVLRVPNPS SKRNEQRIEL FQILRPDEHI 180
 AKQRYIGGKN LPTRGTAEWL SFDVTDVRE WLLRRESNLG LEISIHCPCH TFQPNGDILE 240
 NIHEVMEIKF KGVDNEDDHG RGDGLRLKKQ KDHHNPHLIL MMIPPHRLDN PGQGGQRKKR 300
 ALDTNYCFRN LEENCCVRPL YIDFRQDLGW KWVHEPKGY ANFCSGPCPY LRSADTTHTS 360
 VLGLYNTLNP EASAPCCVP QDLEPLTILY YVGRTPKVEQ LSNMVKSCS CS 412 (SEQ ID NO: 3)

Existen tres receptores de TGF β en humanos, receptor de TGF β 1, 2 y 3, que pueden distinguirse por sus propiedades estructurales y funcionales, que incluyen la afinidad por los miembros de la familia de proteínas TGF β . La unión de una proteína de TGF β a un complejo receptor transmembrana de TGF β homodimérico o heterodimérico activa el mecanismo de señalización de TGF β canónico mediado por proteínas SMAD intracelulares.

La desregulación de TGF β conduce a procesos patológicos que, en humanos, han sido implicados en numerosas afecciones, tales como defectos de nacimiento, cáncer, enfermedades autoinmunes inflamatorias crónicas y enfermedades fibróticas (Border et al., 1994; Border et al., 1995b).

Los TGF β humanos son muy similares a los TGF β de ratón: el TGF β 1 humano solo tiene una diferencia de aminoácido respecto al TGF β 1 de ratón; el TGF β 2 humano solo tiene tres diferencias de aminoácido respecto al TGF β 2 de ratón; y el TGF β 3 humano es idéntico al TGF β 3 de ratón.

E. Moléculas que se unen a factor de crecimiento transformante beta (TGF β)

La presente divulgación describe métodos que comprenden administrar a un sujeto una molécula que se une a TGF β . El ligando de TGF β puede ser cualquier molécula de unión, tal como un anticuerpo, una proteína de fusión (p. ej., una inmunoadhesina), un siARN, un ácido nucleico, un aptámero, una proteína o un compuesto orgánico de molécula pequeña.

En determinados ejemplos, la divulgación describe un anticuerpo que se une a TGF β (un anticuerpo anti-TGF β), o una variante del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos anti-TGF β se unen específicamente a una proteína, un fragmento de polipéptido o un epítipo de TGF β . La molécula que se une a TGF β puede proceder de cualquier especie.

En determinados ejemplos, el anticuerpo que se une a TGF β es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, o una variante del mismo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos

anti-TGF β preferidos previenen la unión de TGF β con sus receptores e inhiben la actividad biológica de TGF β (p. ej., la señalización SMAD intracelular mediada por receptor de TGF β y la actividad celular resultante).

En determinados ejemplos, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es Lerdelimumab (CAT-152), Metelimumab (CAT-192), Fresolimumab (GC-1008), LY2382770, STX-100 ó IMC-TR1.

- 5 En determinados ejemplos específicos, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, o más, de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

HCDR1 – SNVIS (SEQ ID NO: 4);
HCDR2 – GVIPIVDIANYAQRFKG (SEQ ID NO: 5); o
10 HCDR3 – TLGLVLDAMDY (SEQ ID NO: 6).

En otros ejemplos específicos, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, o más, de las siguientes regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 15 LCDR1 – RASQSLGSSYLA (SEQ ID NO: 7);
LCDR2 – GASSRAP (SEQ ID NO: 8); o
LCDR3 – QQYADSPIT (SEQ ID NO: 9).

En un ejemplo específico, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

- 20 En otro ejemplo específico, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8 y 9.

En más ejemplos específicos, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6; y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8 y 9.

- 25 En una realización específica, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10:

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG VIPIVDIANY AQRFKGRVTI
TADESTTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW GQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 10).

En otra realización específica, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11:

- 30 ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRAPGIP DRFSGSGSGT
DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG QGTRLEIK (SEQ ID NO: 11).

En realizaciones más específicas, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

- 35 En algunos ejemplos, el anticuerpo que se une a TGF β comprende además una región constante, p. ej., una región constante de IgG humana. En algunos ejemplos, la región constante es una región constante de IgG4 humana. En ejemplos adicionales, la región constante es una región constante de IgG4 humana modificada. Preferiblemente, la región constante de IgG4 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12:

- 40 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSSLGKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSPDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 12).

- 45 En otros ejemplos, la región constante es una región constante Ck humana. Preferiblemente, la región constante Ck comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13:

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYLSLS
TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO: 13).

En ejemplos específicos, el anticuerpo que se une a TGF β comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14:

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG VIPIVDIANY AQRFKGRVTI
TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW GQGTTLTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE
STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS
NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
5 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 14).

Posiciones 1-120: región variable de la cadena pesada (VH). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.

10 Posiciones 121-447: región constante de IgG4 humana (SwissProt IGHG4_HUMAN).

En otros ejemplos específicos, el anticuerpo que se une a TGFβ comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15:

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQQK PGQAPRLIY GASSRAPGIP DRFSGSGSGT
DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYADSPITFG QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF
15 YPREAKVQWK VDNLQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 15).

Posiciones 1-108: región variable de la cadena ligera (VL). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.

Posiciones 109-215: región constante de Ck humana.

20 En otros ejemplos, el anticuerpo que se une a TGFβ comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

En algunos ejemplos, el anticuerpo que se une a TGFβ es expresado por una célula hospedante como que comprende secuencias líder. La secuencia líder preferiblemente comprende una secuencia de aminoácidos de entre 1 y 30 aminoácidos de longitud, más preferiblemente de 25-25 aminoácidos, y lo más preferiblemente de 19 aminoácidos. La cadena pesada, la cadena ligera, o ambas, la cadena pesada y la cadena ligera, pueden comprender una secuencia líder.

Por ejemplo, la secuencia líder de cadena ligera o pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16: MGWSCILFL VATATGVHS (SEQ ID NO: 16). Por consiguiente, una célula hospedante que expresa una cadena pesada sin procesar puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17:

MGWSCILFL VATATGVHSQ VQLVQSGAEV KKPSSSVKVS CKASGYTFSS 50
NVISWVRQAP GQGLEWMGGV IPIVDIANY QRFKGRVTIT ADESTSTTYM 100
ELSSLRSED AVYYCASTL GLVLDAMDYWG QGTLTVSSA STKGPSVFPL 150
APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG 200
35 LYSLSSVVT VPSSSLGTKY TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPSCPA 250
PEFLGGPSV FLFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG 300
VEVHNAKTKP REEQFNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS 350
IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW 400
ESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA 450
40 LHNHYTQKSL SLSLGLK 466 (SEQ ID NO: 17).

donde

Posiciones 1-19: secuencia líder.

Posiciones 20-139: región variable de la cadena pesada (VH). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.

45 Posiciones 140-466: región constante de IgG4 humana (SwissProt IGHG4_HUMAN).

En otros ejemplos, una célula hospedante que expresa una cadena ligera no procesada puede comprender el aminoácido de la SEQ ID NO: 18:

MGWSCILFL VATATGVHSE TVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSLGS 50
SYLAWYQQK GQAPRLIY ASSRAPGIPD RFSGSGSGTD
50 FTLTISRLEP 100
EDFAVYYCQ QYADSPITFG GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA 150
SVVCLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 200
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 234 (SEQ ID NO: 18).

donde

Posiciones 1-19: secuencia líder.

Posiciones 20-127: región variable de la cadena ligera (VL). Las CDR (regiones determinantes de la complementariedad, según la definición de Kabat) están subrayadas.

5 Posiciones 128-234: región constante de Ck humana.

10 En un ejemplo, el anticuerpo que se une a TGF β es un anticuerpo humanizado o completamente humano. Los ejemplos de isotipos de anticuerpo humanizado y completamente humano incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Preferiblemente, el anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo IgG. Existen cuatro formas de IgG. Preferiblemente, el anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo IgG4. En un ejemplo de la invención, el anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo IgG4 humanizado. En un ejemplo, el anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo IgG4 completamente humano.

15 En la realización más preferida de la invención, el anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo anti-TGF β IgG4 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En un ejemplo alternativo de la invención, el anticuerpo anti-TGF β es un anticuerpo anti-TGF β IgG4 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, comprendiendo la región variable de cadena pesada 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4, 5 y 6, y la región variable de la cadena ligera que comprende 3 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 7, 8 y 9. La identificación, el aislamiento, la preparación y la caracterización de anticuerpos anti-TGF β ,
20 que incluyen el anticuerpo anti-TGF β que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 14 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 15, y las secuencias CDR correspondientes a las SEQ ID NO: 4-9, han sido descritos con detalle en la Patente de los EE.UU. nº 7.723.486, y en la Patente de los EE.UU. nº 8.383.780.

25 Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es "pan- específico" y se une a TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 humanos. Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 humanos y actúa como un antagonista. De la manera más preferida, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 humanos, y neutraliza TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 humanos. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-TGF β panespecíficos adecuados para uso en los métodos de la invención se describen en las Patentes de EE.UU. nº 7.723.476 y 8.383.780.

30 El 1D11.16 es un ejemplo de anticuerpo anti-TGF β panespecífico murino que neutraliza TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 de humano y de ratón en un amplio rango de ensayos in vitro (Dasch et al., 1989; Dasch et al., 1996; R&D System, hoja de producto para MAB1835) y es eficaz en estudios de prueba de principios en modelos animales de fibrosis (Ling et al., 2003; Miyajima et al., 2000; Schneider et al., 1999; Khanna et al., 1999; Shenkar et al., 1994). Sin embargo, puesto que el 1D11.16 es un anticuerpo monoclonal murino (Dasch et al., 1989, Dasch et al., 1996) no es uno
35 preferido para uso terapéutico en humanos. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, se emplean variantes o derivados del anticuerpo 1D11.16 en los métodos descritos en la presente memoria.

Tal como se ha indicado antes, determinados ejemplos también incluyen variantes o derivados de anticuerpos anti-TGF β . Específicamente, la divulgación describe variantes del anticuerpo anti-TGF β que es un anticuerpo anti-TGF β IgG4 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, y una
40 cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. En otros ejemplos, la divulgación describe variantes o derivados del anticuerpo 1D11.16. Las variantes de anticuerpos anti-TGF β pueden presentar propiedades fisicoquímicas similares en base a su elevada similitud, y por tanto también se incluyen dentro del alcance de la invención. Las variantes se definen como anticuerpos con una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 97%, p. ej., al menos un 98% o
45 un 99%, a un anticuerpo anti-TGF β descrito en la presente memoria, y capaz de competir por la unión a un polipéptido de TGF β , un fragmento de polipéptido de TGF β o un epítipo de TGF β . Preferiblemente, las variantes aliviarán, neutralizarán o si no inhibirán la unión de TGF β con sus receptores y la actividad biológica del TGF β (p. ej., la señalización SMAD intracelular mediada por receptor de TGF β y la actividad celular resultante). La determinación de la competencia por la unión a la diana se puede realizar empleando métodos rutinarios conocidos por los
50 especialistas en la técnica. Preferiblemente, las variantes son anticuerpos humanos, y preferiblemente son moléculas de IgG4. En las realizaciones preferidas, una variante es idéntica en al menos un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% ó un 99% en secuencia de aminoácidos con respecto al anticuerpo anti-TGF β IgG4 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, y una cadena ligera que
55 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. El término "variante" se refiere a un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que está alterada en uno o más aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-TGF β . La variante puede tener modificaciones de secuencia conservativas, que incluyen sustituciones, modificaciones, adiciones y eliminaciones de aminoácidos.

Los ejemplos de modificaciones incluyen, aunque sin limitación, glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, ruptura proteolítica, y enlace a un ligando celular u otra proteína. Se pueden introducir modificaciones de aminoácidos mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio, clonación molecular, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos y mutagénesis mediada por PCR aleatoria en los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene propiedades estructurales o químicas similares. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Dichas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina), y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano). Será evidente para el especialista en la técnica que también se pueden emplear otras clasificaciones de familias de residuos de aminoácidos diferentes a la mencionada. Adicionalmente, una variante puede tener sustituciones de aminoácidos no conservativas, p. ej., el reemplazamiento de un aminoácido con un residuo de aminoácido que tenga diferentes propiedades estructurales o químicas. Variaciones menores similares también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Mediante el uso de programas de ordenador bien conocidos en la técnica se puede obtener una guía para determinar qué residuos de aminoácidos se pueden sustituir, modificar, insertar o eliminar sin suprimir la actividad inmunológica. Se pueden usar algoritmos de ordenador tales como, entre otros, Gap o Bestfit, que son conocidos por los especialistas en la técnica, para alinear de forma óptima secuencias de aminoácidos y compararlas y definir residuos de aminoácido similares o idénticos. Las variantes pueden tener las mismas o diferentes, tanto mayores como menores, afinidades de unión en relación a un anticuerpo anti-TGFβ, pero siguen siendo capaces de unirse específicamente a TGFβ, y pueden presentar la misma, superior o inferior, actividad biológica que el anticuerpo anti-TGFβ.

Los ejemplos descritos en la presente memoria también incluyen fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anti-TGFβ. Las expresiones "dominio de unión a antígeno", "región de unión a antígeno", "fragmento de unión a antígeno" y términos similares se refieren a la porción de un anticuerpo que comprende los residuos de aminoácido que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad por el antígeno (p. ej., las regiones determinantes de la complementariedad (CDR)). La región de unión a antígeno puede derivar de cualquier especie animal, tal como roedores (p. ej., conejo, rata o hámster) y humanos. Preferiblemente, la región de unión a antígeno será de origen humano. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión a antígeno incluyen: fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, Fragmentos Fv, moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos dAb, y unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los residuos de aminoácido que imitan la región hipervariable del anticuerpo.

F. Administración terapéutica

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a TGFβ a un sujeto. Tal como se usa en la presente memoria, la frase "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una dosis de anticuerpo que se une a TGFβ que da como resultado una mejoría detectable en uno o más síntomas asociados a la OI, o que produce un efecto biológico (p. ej., un descenso en el nivel de un biomarcador particular) que se correlaciona con un(os) mecanismo(s) patológico(s) subyacente(s) que da(n) lugar a la afección o a el(los) síntoma(s) de la osteogénesis imperfecta. Por ejemplo, una dosis de anticuerpo que se une a TGFβ que aumenta la densidad mineral ósea, aumenta la masa ósea y/o la resistencia ósea, reduce las fracturas óseas y/o dentales, y/o mejora cualquier parámetro diagnóstico de OI, es considerada una cantidad terapéuticamente efectiva.

En una realización, la densidad mineral ósea, la masa ósea y/o la resistencia ósea aumentan aproximadamente entre un 5% y un 200% tras el tratamiento con un anticuerpo que se une a TGFβ. En determinadas realizaciones, la densidad mineral ósea, la masa ósea y/o la resistencia ósea aumentan entre aproximadamente un 5% y aproximadamente el 10%, aproximadamente entre el 10% y el 15%, aproximadamente entre 15% y el 20%, aproximadamente entre el 20% y el 25%, aproximadamente entre el 25% y el 30%, aproximadamente entre el 30% y el 35%, aproximadamente entre el 35% y el 40%, aproximadamente entre el 40% y el 45%, aproximadamente entre el 45% y el 50%, aproximadamente entre el 50% y el 55%, aproximadamente entre el 55% y el 60%, aproximadamente entre el 60% y el 65%, aproximadamente entre el 65% y el 70%, aproximadamente entre el 70% y el 75%, aproximadamente entre el 75% y el 80%, aproximadamente entre el 80% y el 85%, aproximadamente entre el 85% y el 90%, aproximadamente entre el 90% y el 95%, aproximadamente entre el 95% y el 100%, aproximadamente entre el 100% y el 105%, aproximadamente entre el 105% y el 110%, aproximadamente entre el 110% y el 115%, aproximadamente entre el 115% y el 120%, aproximadamente entre el 120% y el 125%, aproximadamente entre el 125% y el 130%, aproximadamente entre el 130% y el 135%, aproximadamente entre el 135% y el 140%, aproximadamente entre el 140% y el 145%, aproximadamente entre el 145% y el 150%, aproximadamente entre el 150% y el 155%, aproximadamente entre el 155% y el 160%, aproximadamente entre el 160% y el 165%, aproximadamente entre el 165% y el 170%, aproximadamente entre el 170% y el 175%, aproximadamente entre el 175% y el 180%, aproximadamente entre el 180% y el 185%, aproximadamente entre el 185% y el 190%, aproximadamente entre el 190% y el 195%, o aproximadamente entre el 195% y el 200%, tras el tratamiento con un anticuerpo que se une a TGFβ.

En determinadas realizaciones, una dosis de un anticuerpo que reduce los biomarcadores de resorción ósea en suero, tal como la hidroxiprolina urinaria, la piridinolina total urinaria (PYD), la desoxipiridinolina libre urinaria (DPD), el N-telopéptido reticulado de colágeno de tipo I urinario (NTX), el C-telopéptido reticulado de colágeno de tipo I urinario o en suero (CTX), la sialoproteína ósea (BSP), la osteopontina (OPN) y la fosfatasa ácida 5b resistente a tartrato (TRAP), se considera una cantidad terapéuticamente efectiva. En una realización, los biomarcadores de resorción ósea en suero se reducen entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 200% tras el tratamiento con un anticuerpo que se une a TGFβ.

En una realización, los biomarcadores de resorción ósea en suero, tales como la hidroxiprolina urinaria, la piridinolina total urinaria (PYD), la desoxipiridinolina libre urinaria (DPD), el N-telopéptido reticulado de colágeno de tipo I urinario (NTX), el C-telopéptido reticulado de colágeno de tipo I urinario o en suero (CTX), la sialoproteína ósea (BSP), la osteopontina (OPN) y la fosfatasa ácida 5b resistente a tartrato (TRAP), disminuyen entre aproximadamente un 5% y aproximadamente el 10%, aproximadamente entre el 10% y el 15%, aproximadamente entre 15% y el 20%, aproximadamente entre el 20% y el 25%, aproximadamente entre el 25% y el 30%, aproximadamente entre el 30% y el 35%, aproximadamente entre el 35% y el 40%, aproximadamente entre el 40% y el 45%, aproximadamente entre el 45% y el 50%, aproximadamente entre el 50% y el 55%, aproximadamente entre el 55% y el 60%, aproximadamente entre el 60% y el 65%, aproximadamente entre el 65% y el 70%, aproximadamente entre el 70% y el 75%, aproximadamente entre el 75% y el 80%, aproximadamente entre el 80% y el 85%, aproximadamente entre el 85% y el 90%, aproximadamente entre el 90% y el 95%, aproximadamente entre el 95% y el 100%, aproximadamente entre el 100% y el 105%, aproximadamente entre el 105% y el 110%, aproximadamente entre el 110% y el 115%, aproximadamente entre el 115% y el 120%, aproximadamente entre el 120% y el 125%, aproximadamente entre el 125% y el 130%, aproximadamente entre el 130% y el 135%, aproximadamente entre el 135% y el 140%, aproximadamente entre el 140% y el 145%, aproximadamente entre el 145% y el 150%, aproximadamente entre el 150% y el 155%, aproximadamente entre el 155% y el 160%, aproximadamente entre el 160% y el 165%, aproximadamente entre el 165% y el 170%, aproximadamente entre el 170% y el 175%, aproximadamente entre el 175% y el 180%, aproximadamente entre el 180% y el 185%, aproximadamente entre el 185% y el 190%, aproximadamente entre el 190% y el 195%, o aproximadamente entre el 195% y el 200%, tras el tratamiento con un anticuerpo que se une a TGFβ.

En determinadas realizaciones, una dosis de un anticuerpo que aumenta los biomarcadores de deposición ósea en suero, tales como la fosfatasa alcalina total, la fosfatasa alcalina específica de hueso, la osteocalcina y el procolágeno de tipo I (C-terminal/N-terminal), se considera una cantidad terapéuticamente efectiva. En una realización, los biomarcadores de deposición ósea en suero aumentan entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 200% tras el tratamiento con un anticuerpo que se une a TGFβ.

En una realización, los biomarcadores de deposición ósea en suero, tales como la fosfatasa alcalina total, la fosfatasa alcalina específica de hueso, la osteocalcina y el procolágeno de tipo I (C-terminal/N-terminal), aumentan entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 10%, aproximadamente entre el 10% y el 15%, aproximadamente entre 15% y el 20%, aproximadamente entre el 20% y el 25%, aproximadamente entre el 25% y el 30%, aproximadamente entre el 30% y el 35%, aproximadamente entre el 35% y el 40%, aproximadamente entre el 40% y el 45%, aproximadamente entre el 45% y el 50%, aproximadamente entre el 50% y el 55%, aproximadamente entre el 55% y el 60%, aproximadamente entre el 60% y el 65%, aproximadamente entre el 65% y el 70%, aproximadamente entre el 70% y el 75%, aproximadamente entre el 75% y el 80%, aproximadamente entre el 80% y el 85%, aproximadamente entre el 85% y el 90%, aproximadamente entre el 90% y el 95%, aproximadamente entre el 95% y el 100%, aproximadamente entre el 100% y el 105%, aproximadamente entre el 105% y el 110%, aproximadamente entre el 110% y el 115%, aproximadamente entre el 115% y el 120%, aproximadamente entre el 120% y el 125%, aproximadamente entre el 125% y el 130%, aproximadamente entre el 130% y el 135%, aproximadamente entre el 135% y el 140%, aproximadamente entre el 140% y el 145%, aproximadamente entre el 145% y el 150%, aproximadamente entre el 150% y el 155%, aproximadamente entre el 155% y el 160%, aproximadamente entre el 160% y el 165%, aproximadamente entre el 165% y el 170%, aproximadamente entre el 170% y el 175%, aproximadamente entre el 175% y el 180%, aproximadamente entre el 180% y el 185%, aproximadamente entre el 185% y el 190%, aproximadamente entre el 190% y el 195%, o aproximadamente entre el 195% y el 200%, tras el tratamiento con un anticuerpo que se une a TGFβ.

Otras realizaciones incluyen la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que mejore la función de órganos no esqueléticos afectados por la OI. Por ejemplo, una dosis de anticuerpo que se une a TGFβ que mejora la función auditiva, pulmonar y/o renal se considera una cantidad terapéuticamente efectiva.

De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a TGFβ es aquella administrada a un sujeto que variará dependiendo de la edad y el tamaño (p. ej., el peso corporal o el área superficial del cuerpo) del sujeto, así como de la ruta de administración, y de otros factores bien conocidos por los especialistas en la técnica.

En determinados ejemplos de realización, el anticuerpo anti-TGFβ se administra al sujeto como una dosis subcutánea. Otros ejemplos de modos de administración incluyen, aunque sin limitación, la ruta intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través del recubrimiento

epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse conjuntamente con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. El anticuerpo de TGFβ puede administrarse parenteralmente o subcutáneamente.

Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar la composición farmacéutica, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Las composiciones terapéuticas se administrarán con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados, que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una mejora en la transferencia, administración, tolerancia, y otras cualidades similares. Una multitud de formulaciones apropiadas se puede encontrar en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tal como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diferentes pesos moleculares), geles semi-sólidos, y mezclas semi-sólidas que contienen carbowax. Ver también Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en formas de dosis en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosis en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse al sujeto usando cualquier dispositivo o mecanismo aceptable. Por ejemplo, la administración se puede llevar a cabo usando una jeringa y una aguja o con un bolígrafo y/o dispositivo de administración autoinyector reutilizable. Los métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de numerosos bolígrafos y/o dispositivos de administración autoinyectores reutilizables para administrar un aglomerante de TGFβ (o una formulación farmacéutica que comprenda al aglomerante). Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen, aunque sin limitación AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, R.U.), el bolígrafo DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), el bolígrafo HUMALOG MIX 75/25™, el bolígrafo HUMALOG™, el bolígrafo HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), el bolígrafo BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo unos pocos. Los ejemplos de bolígrafos y/o dispositivos de administración autoinyectores desechables que tienen aplicación en la administración subcutánea de una composición farmacéutica incluyen, aunque sin limitación, el bolígrafo SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el Autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.), y el bolígrafo HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), por nombrar solo unos pocos.

En la presente memoria también se contempla el uso de un microinfusor para administrar un aglomerante de TGFβ (o una formulación farmacéutica que comprende el aglomerante) a un sujeto. Tal como se usa en la presente memoria, el término "microinfusor" significa un dispositivo de administración subcutánea diseñado para administrar lentamente grandes volúmenes (p. ej., de hasta aproximadamente 2,5 mL o más) de una formulación terapéutica a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (p. ej., de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30 o más minutos). Véase, p. ej., patentes de EE.UU. n° 6.629.949 y 6.659.982; y Meehan et al., J. Controlled Release 46: 107-116 (1996). Los microinfusores son particularmente útiles para la administración de grandes dosis de proteínas terapéuticas contenidas en una concentración elevada (p. ej., aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200 o más mg/mL) y/o disoluciones viscosas.

G. Terapias de combinación

En determinados aspectos, la divulgación describe métodos para tratar OI que comprenden la administración a un sujeto que necesite dicho tratamiento de un anticuerpo que se une a TGFβ en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-TGFβ en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, bisfosfonatos, calcitonina, teriparatide, y cualquier otro compuesto conocido en la técnica para tratar, prevenir o aliviar la osteogénesis imperfecta en un sujeto. En los presentes métodos, el(los) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) puede(n) administrarse concurrente o secuencialmente con el anticuerpo que se une a TGFβ. Por ejemplo, para administración concurrente, se puede preparar una formulación farmacéutica que contenga un anticuerpo que se une a TGFβ y al menos un agente terapéutico adicional. En una realización, el anticuerpo que se une a TGFβ se administra en combinación con bisfosfonatos farmacéuticos (p. ej., Etidronato, Clodronato, Tiludronato, Pamidronato, Neridronato, Olpadronato, Alendronato, Ibandronato, Zoledronato y Risedronato). En otra realización, el anticuerpo que se une a TGFβ se administra en combinación con un fármaco que estimula la formación de hueso, tal como análogos de hormona paratiroide y calcitonina. En otra realización adicional, el anticuerpo que se une a TGFβ se administra en combinación con un modulador de receptor de estrógeno selectivo (SERM). La cantidad de agente terapéutico adicional que se administra en combinación con el anticuerpo que se une a TGFβ en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria puede determinarse fácilmente usando métodos rutinarios conocidos y fácilmente disponibles en la técnica.

Ejemplos

La OI es una enfermedad generalizada del tejido conectivo en la que los individuos afectados presentan una anomalía en la formación de fibrilos de colágeno de tipo I debido a mutaciones en la secuencia primaria de la cadena alfa 1 o la cadena alfa 2 del colágeno de tipo I, así como anomalías en la modificación post-traducciona del colágeno de tipo I y de las proteínas que se unen a fibrilos de colágeno de tipo I. El CRTAP codifica una proteína denominada proteína asociada a cartílago, un miembro del complejo de prolil-3-hidroxilación cuya función es asistir en el plegamiento correcto, la modificación post-traducciona y la secreción de colágeno de tipo I. Las mutaciones en CRTAP son responsables de la osteogénesis imperfecta de tipo VII. Ratones que carecen del gen *Crtap* (*Crtap*^{-/-}) presentan un fenotipo que imita la osteogénesis imperfecta, y se usan como modelo para dicha enfermedad (Morello et al., 2006). En los siguientes ejemplos se usaron ratones *Crtap*^{-/-} y controles de la misma camada de tipo natural (WT) y de la misma edad.

Materiales y métodos

Animales, tratamiento anti-TGFβ y recolección de tejidos

Se generaron y se mantuvieron ratones *Crtap*^{-/-} en un fondo genético mixto C57Black/6J/129Sv. Los ratones que albergan una mutación G610C en el gen *Col1a2* (*Col1a2*^{tm1.1Mcb}) fueron obtenidos y cruzados con ratones C57B1/6J naturales. En los experimentos se usaron los ratones que eran heterocigotos para el alelo *Col1a2*^{tm1.1Mcb}. Los ratones indicadores de TGFβ que expresan luciferasa en respuesta al mecanismo de señalización de TGFβ dependiente de Smad2/3 (ratones SBE-Luc) se obtuvieron y se cruzaron con ratones *Crtap*^{-/-} durante 2 generaciones para generar ratones *Crtap*^{-/-} y compañeros de camada de tipo natural que expresan el transgén indicador. Todos los ratones fueron alojados en un vivarium y los experimentos animales se llevaron a cabo siguiendo el protocolo aprobado por el Comité para Cuidado y Uso de Animales (IACUC, del inglés "Animal Care and Use Committee").

Para los análisis de ARN y proteína, se aisló la calvaria de ratones P3, se limpió de tejido extraesqueletal y se rompió congelada en nitrógeno líquido. Para la inmunotinción de pulmones de ratón P10 *Crtap*^{-/-}, inmediatamente tras sacrificio se inflaron de manera igual los pulmones de todos los ratones por gravedad con un 4% de paraformaldehído a una presión constante de 25 cm de H₂O y a continuación se cerró mediante sutura de la tráquea. A continuación, los pulmones fueron diseccionados cuidadosamente del tórax y fijados en paraformaldehído al 4% durante una noche.

Hembras de ratones *Crtap*^{-/-} y *Col1a2*^{tm1.1Mcb} de ocho semanas de edad fueron tratadas con el anticuerpo neutralizante pan-TGFβ 1D11 durante 8 semanas (10 mg/kg de peso corporal, inyecciones I.P. 3 veces por semana). Los ratones de control *Crtap*^{-/-}, *Col1a2*^{tm1.1Mcb} y WT recibieron un anticuerpo de control (13C4) del mismo isotipo de IgG1. Tras el tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron las espinas lumbares y los fémures y se fijaron en formalina al 10% para microCT e histomorfometría ósea. Los fémures contralaterales de ratones *Crtap*^{-/-} fueron almacenados a -20°C envueltos en una gasa empapada en disolución salina hasta que se llevó a cabo el ensayo biomecánico. Los pulmones de dichos ratones *Crtap*^{-/-} fueron inflados en condiciones iguales, se extrajeron y se fijaron como se ha descrito para los ratones P10. Durante el tratamiento no se pudo aplicar metodología "a ciegas", ya que el anticuerpo 1D11 o el de control fueron inyectados según la asignación de grupo. En todos los análisis posteriores los investigadores permanecieron a ciegas con respecto al genotipo y el grupo de tratamiento.

Inmunotransferencia

Se extrajeron proteínas de las muestras de calvaria P3 rotas en congelación, se transfirieron a 300 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 0,0625 M, pH 7,5, SDS al 2%, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 2 mM e inhibidor de proteinasa RocheComplete) y se homogeneizaron durante 1 minuto, seguido de incubación a 95°C durante 40 minutos. El sobrenadante se transfirió a Unidades de Filtro Centrífugo/Amicon Ultra 3K (Millipore) y se centrifugó para concentrar la proteína. La concentración de proteína total en el lisato se determinó usando el reactivo Micro BCA (Pierce) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se suspendieron 40 µg de extractos de proteínas de calvaria en tampón Laemmli que contenía un 5% de β-mercaptoetanol y se separaron en geles Mini Protean TGX SDS-PAGE (gradiente 4-20%; Bio-Rad) y se transfirieron a membranas de PVDF para los análisis western blot. Las membranas de PVDF fueron incubadas con anticuerpo monoclonal pSmad2 (Cell Signaling n°3108, 1:750 en TBST que contiene un 5% de BSA durante una noche), seguido de anticuerpo anti-conejo ligado a HRP secundario (GE, 1:5000 en TBST que contiene un 5% de BSA durante 2 horas), se trataron con ECL Plus Western Blotting Detection System (GE) y se expusieron a una película de rayos X. Posteriormente, los anticuerpos fueron extraídos de las membranas usando el reactivo ReBlot Plus (Millipore), y se incubaron con anticuerpo monoclonal Smad2 (Cell Signaling n°5339, 1:2000 en TBST que contiene un 5% de BSA durante una noche), seguido de una incubación de anticuerpos secundarios similar y una visualización mediada por ECL. Las películas de rayos X fueron escaneadas y se cuantificó la densidad de cada banda usando el software ImageJ (National Institutes of Health).

PCR cuantitativa en tiempo real

Se extrajo ARN total de calvaria de ratón P3 sometida a rotura por congelación usando el reactivo Trizol (Invitrogen). Se usó el sistema Superscript III RT (Invitrogen) para sintetizar ADNc a partir de ARN total de acuerdo al protocolo

del fabricante. Se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa en un LightCycler v1.5 (Roche) usando cebadores específicos de gen y reactivo SYBR Green I (Roche). Se usó β 2-microglobulina como gen de referencia para normalizar las concentraciones de ADNc.

Obtención de imágenes de bioluminiscencia in vivo

- 5 A ratones P10 Crtap^{-/-} y compañeros de camada naturales que expresan el transgén indicador de TGF β (ratones SBE-Luc) se les inyectó D-luciferina (Goldbio, 150 mg/kg, IP), se les anestesió con isoflurano, y se obtuvieron imágenes 10 minutos después de la inyección usando un sistema de imágenes de bioluminiscencia (Xenogen).

Cultivo de osteoblastos primarios, células indicadoras de TGF β

- 10 Se aislaron células de médula ósea a partir de las tibias y los fémures de ratones Crtap^{-/-} y naturales de aproximadamente 2 meses de edad y se cultivaron en α -MEM suministrado con un 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina y 100 ug/mL de estreptomycin. El medio se cambió cada dos días y las células no fijadas se desecharon. Tras 7 días, las células fijadas, definidas como células estromales de médula ósea (BMSCs), se volvieron a sembrar en placas de 24 pocillos en una concentración de $2,5 \times 10^4$ células por cm² y se cultivaron en medio osteogénico (α -MEM, 10% de FBS, ácido ascórbico 500 μ M, y β -glicerofosfato 10 mM) durante 3 días. Se recogió el medio
- 15 condicionado y se incubó con células epiteliales de pulmón de visón indicadoras de PAI-luciferasa. Tras 24 horas, se recolectaron los lisatos celulares para evaluarlos en ensayos de actividad de luciferasa, que se determinó usando el sistema "Dual-Luciferase Reporter System" (Promega). Los resultados se normalizaron a la cantidad de proteína total cuantificada usando el reactivo Micro BCA (Pierce).

MicroCT, histomorfometría ósea

- 20 Se escanearon vértebras lumbares y fémures usando un micro CT Scanco μ CT-40 para cuantificación de los parámetros óseos trabeculares y corticales. Los parámetros óseos trabeculares vertebrales y femorales fueron analizados usando el software de análisis Scanco perfilando manualmente el contorno de hueso trabecular del cuerpo vertebral L4, así como la sección metafisaria distal del fémur. Los parámetros óseos corticales del centro de la zona media femoral fueron cuantificados usando el algoritmo de umbral automatizado incluido en el software.
- 25 A continuación se embebieron muestras de espina de ratón Crtap^{-/-} descalcificadas escaneadas en plástico para su seccionamiento. Se llevó a cabo una tinción con azul de toluidina y una tinción TRAP usando protocolos estándares para la visualización y la cuantificación de Ob's y Oc's, respectivamente, usando el sistema "Bioquant Osteo Image Analysis System".

Inmunotinción e histología

- 30 Para la inmunohistoquímica, se recolectaron patas traseras de ratones P5, se fijaron durante una noche en paraformaldehído al 4% y se embebieron en parafina. Tras desparafinación y rehidratación, se llevó a cabo una recuperación de antígeno inducida térmicamente (Dako, S1700) seguida de tratamiento con hialuronidasa durante 30 minutos (2 mg/mL; Sigma). Se bloqueó la peroxidasa endógena usando peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Tras incubación con disolución de bloqueo (suero de cabra normal al 3%; BSA al 0,1%, Triton X-100 al 0,1% en PBS), las secciones fueron incubadas en anticuerpos de TGF β 1 (G1221, Promega) y decorina (LF-113, suministrados gentilmente por Larry Fisher, "National Institute of Dental and Craniofacial Research", Bethesda, MD, EE.UU.) durante 60 minutos (cada dilución 1:25 en PBS, las muestras de control se incubaron solo en PBS) a 37°C, y posteriormente fueron incubadas con anticuerpo secundario (kit "SuperPicTure Ploymer Detection", Invitrogen). Se
- 35 añadió sustrato DAB según las recomendaciones del fabricante y las muestras fueron deshidratadas y montadas usando el medio de montaje basado en xileno Cytoseal XYL (Thermo Scientific). Las secciones de WT y de compañeros de camada mutantes fueron procesadas al mismo tiempo. Las imágenes de hueso trabecular fueron tomadas con un microscopio óptico (Axioplan 2, Zeiss) usando tiempos de exposición idénticos para los compañeros de camada WT y mutantes.
- 40

- 45 Los pulmones de ratones P10 y Crtap^{-/-} de 16 semanas de edad fueron inflados de igual manera durante la recolección de tejidos, fijados en paraformaldehído al 4% y embebidos en parafina. Los pulmones de ratones P10 Crtap^{-/-} y naturales se usaron para inmunotinción de pSmad2. Resumidamente, las secciones de parafina fueron tratadas con xileno, rehidratadas y calentadas durante 20 minutos para recuperación de antígeno (pH 6; Dako). A continuación se incubaron las secciones en disolución bloqueante (suero de asno normal al 3%, BSA al 0,1%, Triton X-100 al 0,1% en PBS), y posteriormente se incubaron con anticuerpo anti-pSmad2 de conejo (1:500) (Cell signaling, nº3108), anticuerpo secundario anti-conejo de asno conjugado a Alexa flour 594 (1:600) (Invitrogen), y montadas con reactivo antiborrado Prolong Gold con DAPI (Invitrogen). Las imágenes fluorescentes de dichas secciones fueron adquiridas usando un microscopio Zeiss (software Axiovision) usando
- 50

tiempos de exposición idénticos.

- 55 Para la histología y morfometría pulmonar de los ratones de 16 semanas de edad, se tiñeron secciones parasagiales usando un protocolo estándar para la tinción con hematoxilina y eosina. Se usó el método de intercepción lineal media (MLI) para cuantificar la distancia entre las estructuras alveolares. Resumidamente, se

capturaron 10 campos histológicos por ratón con un aumento 20X a partir de todos los lóbulos de ambos pulmones usando un microscopio óptico (Axioplan 2, Zeiss). La MLI se midió usando el software modificado ImageJ (National Institutes of Health, modificado por Paul Thompson). Tras la retirada manual de vasos sanguíneos, vías aéreas grandes y otras estructuras no alveolares, el software promedia automáticamente el tejido alveolar de cada imagen y superpone una rejilla de líneas que consta de 1.353 líneas, que miden cada una 21 píxeles sobre la imagen. El número de líneas que interceptaban estructuras alveolares se usó para calcular la MLI.

Evaluación biomecánica por torsión de 3 puntos

Los fémures WT y de *Crtpap^{-/-}* fueron evaluados por torsión de tres puntos usando un alcance de 6 mm con un dispositivo Instron 5848 (Instron Inc., Norwood, MA). Todos los fémures fueron evaluados húmedos y a temperatura ambiente. Se precargaron a 1N con una velocidad de 0,05 N/s durante 5 segundos. Tras el proceso de precarga, los fémures fueron cargados hasta fallo con una velocidad de 0,1 mm/s. Los datos de carga y desplazamiento fueron capturados a una velocidad de 40Hz usando el software BLUEHILL (Instron 5848).

Para determinar el Límite de Elasticidad, se identificó una región después de la precarga y antes de la carga máxima en la curva de carga-desplazamiento. Esta región se separó en 5 segmentos a partir de los cuales se tomó la línea ajustada de segmento de mayor pendiente. A continuación, se implementó una compensación de 0,012 mm en la línea. El punto de intersección entre la línea compensada y la curva de carga-desplazamiento fue el Límite de Elasticidad Compensado 0,012. Este límite de elasticidad correspondía más estrechamente a la cepa de compensación de 0,2%, que es la elegida habitualmente en bibliografía. La región elástica se identificó como la región a partir de la finalización de la precarga hasta el límite de elasticidad. La región poslímite se identificó como la región desde el límite de elasticidad hasta el punto en el cual el cambio en la carga excedía -1N, indicando fallo. El Desplazamiento Elástico fue el desplazamiento durante el cual el espécimen permanecía en la región elástica. El Desplazamiento poslímite fue el desplazamiento durante el cual el espécimen permanecía en la región poslímite. El Desplazamiento Total se calculó como la suma del Desplazamiento Elástico y el Desplazamiento poslímite. Usando el método de integración numérica trapezoidal, se calculó la energía a fallo como el área bajo la curva Carga-Desplazamiento. La Carga Máxima se determinó encontrando el valor de carga más elevado registrado con el BLUEHILL, antes de que el espécimen fallara. Para calcular la Rigidez, se aplicó el método de ajuste de Mínimos Cuadrados al segmento de mayor pendiente de la región elástica de la curva de carga-desplazamiento. La rigidez fue la pendiente de la línea de ajuste de mínimos cuadrados. Los datos geométricos (diámetro y momento de inercia) obtenidos a partir del análisis de microCT de la parte media femoral se utilizaron para calcular las propiedades intrínsecas del material: resistencia final, resistencia a fallo y módulo elástico.

Marcadores de tasa de recambio óseo en suero

La osteocalcina (OCN) en suero se cuantificó usando el kit "Mouse Osteocalcin EIA" de Biomedical Technologies Inc. El telopéptido reticulado C-terminal de colágeno óseo (CTX) se cuantificó usando el kit RatLaps™ EIA de Immunodiagnostic Systems Ltd. Ambos análisis se llevaron a cabo según los protocolos del fabricante.

SDS-PAGE, espectrometría de masas y análisis de reticulación de colágeno

Para la espectrometría de masas, se preparó colágeno de tipo I de tibias *Crtpap^{-/-}* y naturales. El hueso se desengrasó con cloroformo/metanol (3:1 v/v) y se desmineralizó en EDTA 0,5 M, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, todas las etapas a 4°C. El hueso se molió finamente y se solubilizó el colágeno mediante desnaturalización térmica (90°C) en tampón de muestreo de SDS-PAGE. Las cadenas α de colágeno fueron cortadas de los geles de SDS-PAGE y sometidas a digestión de tripsina en el gel. Se llevó a cabo una MS de electropulverización sobre los péptidos tripticos usando un espectrómetro de masas de trampa iónica LCQ Deca XP equipado con cromatografía de líquidos (LC) en línea (ThermoFinnigan) usando un columna capilar C8 (300 μ m x 150 mm; Grace Vydac 208 MS5.315) eluido a 4,5 μ L min. Se usó el software Sequent search (ThermoFinnigan) para la identificación de péptidos

usando la base de datos de proteínas NCBI.

Las reticulaciones de piridinolina (HP y LP) se cuantificaron mediante HPLC tras hidrolizar el hueso desmineralizado en HCl 6N.

Análisis de resonancia de plasmón superficial

Los experimentos de resonancia de plasmón superficial se llevaron a cabo usando un instrumento BIAcore X (GE Healthcare Bio-Science Corp.). Se inmovilizó colágeno de tipo I de tendón de ratón nativo purificado procedente de ratones naturales y *Crtpap^{-/-}* sobre un chip sensor CM5 mediante acoplamiento de amida a una concentración de aproximadamente 0,05 ng/mm² (500 RU) y 0,08 ng/mm² (800 RU), respectivamente. Los experimentos fueron llevados a cabo con un caudal de 10 μ L/min y 20°C en tampón HBS-P (tampón Hepes 10 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 150 mM y un 0,005% de tensioactivo P20). Se inyectó proteína de núcleo decorina humana recombinante (R&D Systems) en ambos chips CM5 de tipo I. Se determinó la concentración de la disolución de reserva de decorina humana mediante análisis de aminoácidos. La respuesta de unión de decorina a colágeno de tipo I de ratón natural y *Crtpap^{-/-}* se normalizó mediante las cantidades de colágeno de tipo I inmovilizado sobre los chips sensores

CM5. Se usaron tres concentraciones de decorina (3, 5 y 12 μ M), para cada concentración el análisis se repitió tres veces. Este experimento se llevó a cabo dos veces con colágeno aislado de diferentes ratones cada vez.

Métodos estadísticos

Las comparaciones entre dos grupos se realizaron usando test de t de Student de dos colas desparejados. Para las comparaciones entre tres grupos, se llevó a cabo un Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA) si se confirmaba una varianza de grupos igual, tras una comparación múltiple por pares usando el método de Holm-Sidak. Si el test de varianza igual fallaba, se aplicó un ANOVA en Rangos Unidireccional de Kruskal-Wallis, seguido de comparación múltiple por pares usando el test de Tukey. Un valor P inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo para el test de t de Student, el ANOVA y el ANOVA en Rangos Unidireccional de Kruskal-Wallis. Para las comparaciones múltiples por pares a posteriori, se comparó cada valor P con un nivel crítico dependiente del rango del valor P y del número total de comparaciones realizadas para determinar si las diferencias entre los grupos eran significativas. Para los análisis estadísticos se usó Sigma Plot V11.0 (Systat Software Inc.).

Los efectos de 1D11 sobre los huesos y los pulmones de ratones OI eran desconocidos al inicio del estudio. Para determinar el tamaño de muestra inicial por grupo de ratones, calculamos que para detectar una diferencia mínima del 20% en masa ósea (BV/TV) mediante MicroCT entre los ratones OI tratados con 1D11 y de control con una potencia del 90%, se requería un tamaño de grupo de 8 ratones.

Ejemplo 1: Señalización de TGF β alterada en calvaria de Crtp $^{-/-}$

Se analizaron ratones Crtp $^{-/-}$ y controles de compañeros de camada naturales (WT) de la misma edad para determinar la expresión de pSmad2 activada, un miembro del mecanismo de señalización del TGF β , así como de otras dianas posteriores de TGF β . Los huesos calvaria fueron escindidos y se extrajo ARN y proteínas y se analizaron mediante PCR en tiempo real y análisis Western blot, respectivamente. Como puede observarse en la Figura 1A y 1B, los ratones Crtp $^{-/-}$ presentaron una relación un 100% superior de pSmad2 activado con respecto a Smad2 total en comparación con los ratones WT, medido mediante Western blot y cuantificado mediante densitometría, lo que indica que la señalización de TGF β está elevada en los ratones Crtp $^{-/-}$. Las dianas transcripcionales del TGF β , tal como Col1a1 y p21, estaban elevadas en comparación con los controles WT, según se determinó mediante RT-PCR y como demuestran la Figura 1C y la Figura 1D, respectivamente. Se midió el factor de crecimiento de tejido conectivo de proteína ECM profibrótica (CTGF) y se observó que era aproximadamente un 50% superior en los ratones Crtp $^{-/-}$ respecto a los controles WT, según se determinó mediante RT-PCR y como se demuestra en la Figura 1E. Tal como se muestra en la Figura 1F, el análisis de RT-PCR reveló que la expresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27 no se ve alterado ni en el grupo de ratones Crtp $^{-/-}$ ni en el de ratones WT.

Ejemplo 2: Aumento de actividad de TGF β en ratones Crtp $^{-/-}$ in vivo y en células crtp $^{-/-}$ osteoblásticas

Se cruzaron ratones Crtp $^{-/-}$ con ratones indicadores de TGF β que expresan luciferasa en respuesta a la activación de la señalización de TGF β (Jackson Laboratory; B6.Cg-Tg(SBE/TK-luc)7Twc/J). Se inyectó a ratones P9 con el sustrato D-Luciferina (150 mg/kg) 10 minutos antes de obtener las imágenes (Xenogen; sistema de cámara IVIS). Tal como demuestra la Figura 2A, los ratones Crtp $^{-/-}$ presentaron una luminiscencia considerablemente mayor en sus colas, huesos largos y calvarias que los controles WT, lo que indica un aumento de la actividad de TGF β en ratones crtp $^{-/-}$. La Figura 2B muestra la cuantificación de la actividad de luciferasa en la calvaria.

Se aislaron células estromales de médula ósea (BMSC) a partir de ratones Crtp $^{-/-}$ y ratones WT, se cultivaron en condiciones osteogénicas ex vivo, y se analizó el medio de cultivo condicionado para determinar la actividad de TGF β usando una línea celular que expresa luciferasa en respuesta a la activación de la señalización de TGF β . Tal como se muestra en la Figura 2C, el medio condicionado para BMSC de Crtp $^{-/-}$ dio como resultado una actividad de luciferasa casi dos veces superior a la de la línea de células indicadoras en comparación con las BMSC de ratones WT. Considerados en conjunto, estos datos indican que la secreción y actividad de TGF β está elevada en los huesos y las células osteoblásticas de ratones Crtp $^{-/-}$.

Ejemplo 3: Análisis μ CT de vértebras Crtp $^{-/-}$

A ratones Crtp $^{-/-}$ de 8 semanas de edad (N = 6 por grupo) se les administró 1D11 (10 mg/kg, I.P., 3 veces/semana, 8 semanas en total), un sustituto de murino del anticuerpo panespecífico que se une a TGF β que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15. Se administró un anticuerpo no relacionado 13C4 a un grupo separado de ratones Crtp $^{-/-}$ y ratones WT como control (N = 6). Se obtuvieron imágenes de los cuerpos vertebrales L4 de ratones de 16 semanas de edad (tratados en las semanas 8-16) mediante μ -CT. En la Figura 3 se muestran los datos de MicroCT de cuerpos vertebrales L4 procedentes de ratones Crtp $^{-/-}$ de 8 semanas de edad (n = 6 por grupo) que fueron tratados con el anticuerpo neutralizante de TGF β 1D11 (Genzyme; 10 mg/kg, I.P., 3 veces/semana) durante 8 semanas y de ratones naturales (WT) y de ratones Crtp $^{-/-}$ de control que fueron tratados con un anticuerpo de control (13C4-placebo). Tal como se muestra en la Figura 3, las vértebras de Crtp $^{-/-}$ eran cavernosas en comparación con las vértebras del control WT. Sin embargo, el tratamiento con 1D11 dio como resultado un fenotipo esquelético que era comparable a la condición WT.

Los datos de la Figura 3 se cuantificaron en la Figura 4, el tratamiento con el anticuerpo anti-TGF β panespecífico rescató el fenotipo esquelético de los ratones Crtap^{-/-}. Las vértebras de ratones Crtap^{-/-} tratados fueron estadísticamente similares a los ratones de control WT en los parámetros medidos, que incluyen la densidad de volumen óseo (BV/TV), la superficie ósea total (BS), la densidad de superficie ósea (BS/BV), el número trabecular (Tb.N), el espesor trabecular (Tb.Th), el espaciado trabecular (Tb.Sp) y el volumen total (Dens TV).

Ejemplo 4: Histomorfometría de vértebras de Crtap^{-/-} tratadas con anti-TGF β

Además de μ -CT, los huesos vertebrales de los ratones tratados con anticuerpo, de los tratados con placebo y de ratones WT, fueron analizados mediante histomorfometría. Tal como se muestra en la Figura 5A y la Figura 5B, los resultados de μ -CT fueron confirmados mediante análisis histomorfométrico. Adicionalmente, se tiñeron secciones de tejido para determinar la expresión del marcador de osteoclastos TRAP. El análisis reveló que había más osteoclastos cubriendo más de la superficie ósea en los ratones Crtap^{-/-} que en los controles WT (N.Oc/BS y Oc.S/BS), lo que indica un aumento de la actividad osteoclástica. El tratamiento con 1D11 anti-TGF β redujo todos los parámetros específicos de osteoclasto por debajo de los valores correspondientes a WT. Por tanto, se identificó a los osteoclastos como una diana potencial para anticuerpos de TGF β , y más específicamente para anticuerpos anti-TGF β panespecíficos.

Ejemplo 5: Ensayo de torsión de tres puntos de fémures de Crtap^{-/-} tratados con anti-TGF β

Los ensayos biomecánicos se llevaron a cabo sobre fémures escindidos de ratones de 16 semanas de edad (después de tratamiento en las semanas 8-16) usando un ensayo de torsión de tres puntos estándar con un dispositivo Instron 5848 (Instron Inc., Norwood MA) con un alcance de 6 mm, precargado a 1N con una velocidad de 1N/s durante 5 segundos. Después de la precarga, los fémures fueron comprimidos hasta fallo a una velocidad de 0,1 mm/s. Los datos de carga y desplazamiento fueron capturados a una velocidad de 40 Hz usando el software BLUEHILL (Instron 5848).

Tal como se demuestra en la Figura 6, los fémures de ratón Crtap^{-/-} fueron menos rígidos y fueron capaces de soportar una carga máxima significativamente menor que los ratones de control WT. Los fémures de ratones Crtap^{-/-} tratados con 1D11 mostraron una mejora significativa en la carga máxima, y presentaron una tendencia a aumentar la rigidez en comparación con los ratones Crtap^{-/-}.

Por tanto, el tratamiento con el anticuerpo anti-TGF β panespecífico 1D11 restauró de manera cuantitativa, cualitativa y biomecánica el fenotipo esquelético de los ratones Crtap^{-/-}.

Ejemplo 6: La inhibición de la señalización de TGF β con 1D11 mejora el fenotipo pulmonar.

Los ratones Crtap^{-/-} presentan una enfermedad de tejido conectivo generalizada que se manifiesta a través de una baja masa ósea, glomeruloesclerosis y displasia pulmonar (Baldrige et al.; PLoSone, 5(5): e10560 (2010)). Se observó un aumento de la expresión de TGF β en pulmones de ratones Crtap^{-/-}, tal como evidencia la inmunotinción positiva para pSmad2 y como se demuestra en la Figura 7A. Histológicamente, los ratones Crtap^{-/-} exhibieron un aumento del espacio aéreo distal en comparación con los ratones WT, tal como se muestra en la Figura 7B. El tratamiento con 1D11 (10 mg/kg, IP, 3x/semana durante 8 semanas) redujo la expresión de pSmad2 en los ratones Crtap^{-/-} y redujo el espacio aéreo distal y mejoró el fenotipo pulmonar, como demuestran la Figura 7A y la Figura 7B, y como se cuantifica en la Figura 7C (*P<0,05 vs. Crtap^{-/-} de control; 10 imágenes analizadas por ratón, n=8 ratones por grupo).

Ejemplo 7: Expresión de decorina en pulmones de Crtap^{-/-}

Se investigaron los reguladores transcripcionales de la expresión de TGF β con el objetivo de comprender la base de la desregulación de la señalización de TGF β en los huesos y pulmones de ratones Crtap^{-/-}. Una clase principal de proteínas extracelulares que pueden regular la TGF β en ECM incluye los proteoglicanos ricos en leucina pequeños (SLRP), tal como la decorina. La inmunotinción reveló un aumento de la expresión de decorina en pulmones de Crtap^{-/-} en comparación con los pulmones WT de control, tal como muestra la Figura 8.

Como la decorina es un regulador de TGF β maduro, este descubrimiento sugiere que una modificación post-traduccional alterada del colágeno, como sucede en la OI, altera las interacciones de las proteínas ECM, incluyendo los SLRP. La decorina se une a sitios de hidroxiprolina, tal como el localizado en el residuo de aminoácido 396 de los colágenos de tipo I y tipo II, que están ausentes en ratones Crtap^{-/-}. Se realizó un ensayo de unión a decorina para determinar si la unión de decorina puede alterarse en la OI, y si esto puede ser responsable, al menos parcialmente, de los fenotipos observados en huesos y ratones Crtap^{-/-}. Tal como se muestra en la Figura 9, la unión de decorina a péptidos de colágeno 3-hidroxilados (como en el colágeno de tipo I y II) fue mayor que a péptidos de colágeno sin 3-hidroxilación (como en el colágeno de tipo III).

Ejemplo 8: El aumento de la señalización de TGF β es un mecanismo común en la Osteogénesis Imperfecta

La OI se caracteriza por huesos frágiles, una baja masa ósea, deformidades óseas y fracturas. Además, manifestaciones extraesqueléticas que incluyen anomalías en los pulmones contribuyen sustancialmente a la

mortalidad y la morbilidad. La mayoría de los casos de OI son causados por mutaciones dominantes autosomales en los genes que codifican colágeno de tipo I (COL1A1 y COL1A2). En años recientes, se han identificado mutaciones en genes adicionales que codifican las proteínas implicadas en la modificación post-traducciona de colágeno como causantes de formas recesivas de la OI. La primera descrita fue en la proteína asociada a cartilago (CRTAP), un miembro del complejo de prolil-3-hidroxilasa que es responsable de la 3-hidroxilación del residuo de prolina 986 α 1(I) en el colágeno de tipo I. Las mutaciones hipomórficas de CRTAP conducen a una pérdida parcial de 3-hidroxiprolina (3Hyp) en el colágeno fibrilar, así como la sobremodificación de otros residuos, y dan como resultado la OI recesiva de tipo VII, que se solapa clínicamente con las formas dominantes de la OI grave. La función fisiológica de la 3Hyp no se entiende completamente, pero los estudios bioquímicos sugieren que puede estar implicada en las interacciones colágeno-proteína, más que afectar de forma negativa a la estabilidad del colágeno.

La ECM es un importante reservorio para moléculas de señalización y sus reguladores. En los huesos, el TGF β actúa como un coordinador central de la remodelación ósea acoplando la actividad localizada de los osteoclastos resorbedores de hueso y los osteoblastos formadores de hueso. El TGF β es producido de manera abundante por los osteoblastos, es secretado predominantemente en formas latentes inactivas y se deposita en la matriz ósea. Ahí puede ser liberado y activado durante la resorción ósea por los osteoclastos. Como nivel de regulación adicional, el TGF β activo puede ser ligado por proteoglicanos, que modulan su bioactividad en asociación con fibrilos de colágeno. Debido a que el colágeno de tipo I es el componente más abundante de la ECM en el hueso, esto genera la intrigante hipótesis de que la alteración de la estructura de colágeno observada en la OI no solo aumenta la fragilidad del hueso, sino que también afecta a la función de reservorio de señalización de la matriz ósea. De forma destacable, los ratones *Crtap*^{-/-} muestra un solapamiento fenotípico con modelos animales con aumento de señalización de TGF β . Por ejemplo, la sobreexpresión de TGF β da como resultado una baja masa ósea. Adicionalmente, los ratones *Crtap*^{-/-} exhiben un agrandamiento del espacio aéreo alveolar en los pulmones, que es similar al observado en un modelo de ratón para el síndrome de Marfan, donde se ha demostrado que un aumento de la señalización de TGF β es un contribuyente principal de la patología pulmonar. Por lo tanto, se estudió el estatus de la señalización de TGF β en el modelo de ratones *Crtap*^{-/-} de la OI recesiva.

Para determinar el estatus de señalización de TGF β en el hueso, se evaluaron los niveles de expresión de los genes diana del TGF β en huesos calvaria de ratones *Crtap*^{-/-}. En comparación con las muestras naturales (WT), los huesos *Crtap*^{-/-} mostraron un aumento de la expresión de las dianas posteriores de TGF β p21 (inhibidor 1 de quinasa dependiente de ciclina), PAI-1 (inhibidor 1 de activador de plasminógeno) y Col1a1, en consistencia con un aumento de la actividad de TGF β (Figura 10A). Para confirmar el aumento de la activación del mecanismo de señalización de TGF β intracelular, se evaluó el estatus de Smad2, una segunda proteína mensajera intracelular, que se vuelve fosforilada tras activación de los receptores de TGF β . En consistencia con la expresión génica de diana, los análisis de inmunotransferencia demostraron un mayor ratio de Smad2 fosforilada (pSmad2) a Smad2 total en las muestras de hueso de ratones *Crtap*^{-/-}, lo que indica un aumento de la señalización de TGF β (Figuras 10B y 10C).

Para determinar si estas medidas estáticas reflejan el aumento de actividad de TGF β in vivo, los ratones *Crtap*^{-/-} fueron inter cruzados con ratones indicadores de TGF β que expresan luciferasa bajo el control de elementos de unión de Smad que responden a TGF β (ratones SBE-Luc). En comparación con compañeros de camada WT/SBE-Luc, los ratones *Crtap*^{-/-}/SBE-Luc mostraron un aumento de la bioluminiscencia de áreas sobre las estructuras esqueléticas, lo que indica un aumento de la actividad de TGF β in vivo (Figura 10D). En 3 camadas, los ratones *Crtap*^{-/-} muestran una media de 2,86 veces (SD $\pm$ 0,34) la señal de bioluminiscencia en la cabeza/calvaria en comparación con los ratones WT. Además, a fin de evaluar si el aumento de la señalización de TGF β /Smad asociada a la pérdida de *Crtap* es intrínseco del hueso, es decir, autónomo de tejido, se diferenciaron células estromales de médula ósea (BMSC) en células osteoblásticas in vitro. Usando una línea celular indicadora de TGF β , se observó que el medio acondicionado procedente de BMSC de *Crtap*^{-/-} exhibía una mayor actividad de TGF β en comparación con el medio procedente de BMSC WT (Figura 10E). Considerados en conjunto, estos descubrimientos indican que la pérdida de *Crtap* potencia la señalización de TGF β en hueso de un modo autónomo de tejido.

Los pacientes con OI severa también pueden presentar anomalías pulmonares intrínsecas, y el fallo respiratorio es una de las causas principales de fallecimiento en estos individuos. De forma destacable, los ratones *Crtap*^{-/-} muestran un aumento difuso del espacio aéreo alveolar, una característica asociada al aumento de la señalización de TGF β en otros modelos de desarrollo. Por consiguiente, los pulmones de ratones *Crtap*^{-/-} mostraron un aumento de la tinción intracelular para pSmad2 en células alveolares, lo que indica que el aumento de actividad de TGF β también está presente en tejidos extraesqueléticos (Figura 10F).

Para entender si el aumento de la señalización de TGF β representa un mecanismo causal que contribuye a los fenotipos óseos y pulmonares en ratones *Crtap*^{-/-}, se llevó a cabo un experimento de rescate con un anticuerpo neutralizante pan-TGF β (1D11). Se trataron ratones *Crtap*^{-/-} de ocho semanas de edad con 1D11 durante 8 semanas; los ratones *Crtap*^{-/-} y WT de control recibieron un anticuerpo de control no específico (13C4). El 1D11 no cambió de forma significativa el peso corporal de los ratones *Crtap*^{-/-} tratados, lo que indica que la inhibición de TGF β no afectó al estatus nutricional general (Figura 14). Adicionalmente, los análisis de espectrometría de masas y de reticulamiento mostraron que el 1D11 no cambia de forma significativa el estatus de la 3-hidroxilación de P986 de colágeno de tipo I o las reticulaciones de colágeno en ratones *Crtap*^{-/-}, lo que sugiere que la señalización de TGF β desregulada es una consecuencia de la estructura de colágeno molecular alterada, y no está implicada directamente en el procesamiento de colágeno intracelular o en el montaje de fibrilos extracelular (Figura 15). Los ratones *Crtap*^{-/-}

exhiben una masa ósea reducida y parámetros óseos trabeculares anormales (Figuras 11A y 11B). El análisis mediante imágenes MicroCT de vértebras demostró que en comparación con los ratones *Crtp^{-/-}* de control, la inhibición de TGFβ mejoró de forma significativa los parámetros óseos trabeculares, que incluyen el volumen óseo/volumen total, el número trabecular y el espesor trabecular, hasta valores próximos a los WT (Figuras 11A y 11B, y Figura 17). Se observaron efectos beneficiosos similares en hueso trabecular femoral en ratones *Crtp^{-/-}*, donde la inhibición de TGFβ mejoró de forma significativa los parámetros óseos trabeculares (Figura 18). Los efectos de la inhibición de TGFβ sobre el esqueleto con 1D11 se han publicado previamente para ratones WT y en ratones *Esl-1^{-/-}*, un modelo con actividad de TGFβ incrementada debido a un defecto en la maduración normal del TGFβ. Mientras que el 1D11 aumentó de forma moderada el BV/TV trabecular, en un 33%, en la espina en ratones WT, los ratones *Esl-1^{-/-}* exhibieron un aumento del 106% en el BV/TV. Esto sugirió que la utilización de TGFβ en una situación patofisiológica donde aumenta en el esqueleto, podría conducir a un efecto positivo relativamente más pronunciado. En el presente estudio, el 1D11 aumentó el BV/TV trabecular en la espina en un 235% en ratones *Crtp^{-/-}*, lo que apoya que la señalización de TGFβ desregulada es un contribuyente importante de la baja masa ósea en ratones *Crtp^{-/-}*. En la zona media del fémur, los parámetros de arquitectura cortical, que incluyen el espesor cortical, el diámetro, el área de sección transversal y los momentos de inercia de sección transversal, en ratones *Crtp^{-/-}* fueron significativamente menores que en los ratones WT. Tras el tratamiento con 1D11, dichos parámetros ya no eran significativamente diferentes respecto a los de ratones WT (Figura 19). Para evaluar si estos cambios en el hueso cortical y trabecular se traducían en una mejoría de la resistencia ósea, se llevó a cabo una evaluación biomecánica mediante un ensayo de torsión de 3 puntos de los fémures. Se observó que la inhibición de TGFβ fue capaz de aumentar la carga máxima y la resistencia final en los ratones *Crtp^{-/-}* tratados, lo que indica una mejor resistencia ósea y tisular global y una mejor resistencia a fractura. Sin embargo, el tratamiento con 1D11 no tuvo efectos sobre el aumento de fragilidad del hueso de Ol, tal como indica la reducción del desplazamiento poslímite tanto en ratones *Crtp^{-/-}* de control como en ratones *Crtp^{-/-}* tratados con 1D11 (Figura 20). Probablemente esto refleja la mineralización anormal inherente asociada a una estructura de colágeno alterada. Considerados en conjunto, estos descubrimientos indican que el aumento de la señalización de TGFβ es el principal contribuyente al fenotipo óseo en la Ol recesiva, que resulta de una deficiencia de *Crtp*, y que la inhibición de la señalización de TGFβ desregulada restaura la masa ósea, los parámetros microestructurales y mejora la resistencia global del hueso.

Para comprender los efectos de la inhibición de TGFβ en ratones *Crtp^{-/-}* a nivel celular, se llevaron a cabo análisis histomorfométricos con ratones tratados. En las secciones de cuerpos vertebrales de este estudio se observó un aumento de los números de osteoclastos (Oc) y osteoblastos (Ob) por superficie ósea en los ratones *Crtp^{-/-}* de control respecto a los ratones WT, lo que indica un aumento de la remodelación ósea en la espina (Figura 11C y Figura 21). De forma consistente, los marcadores de tasa de recambio ósea en suero, osteocalcina (OCN) y telopéptido reticulado C-terminal de colágeno óseo (CTX), fueron elevados en ratones *Crtp^{-/-}* de control de 8 semanas de edad (OCN y CTX) y de 16 semanas de edad (solo CTX) (Figura 19). Se han descrito cambios similares en la composición celular del hueso en pacientes con Ol dominante y recesiva, que muestran un aumento de los números Oc y Ob consistente con un aumento de la tasa de recambio ósea. De forma destacable, los modelos de ratón de señalización de TGFβ incrementada muestran una baja masa ósea con un incremento de la resorción ósea osteoclástica y de la remodelación ósea anormal. La mayoría de las publicaciones de los efectos del TGFβ sobre las células óseas son consistentes con un modelo en el que el TGFβ puede estimular el reclutamiento y la diferenciación inicial de precursores de Oc y Ob en el sitio de la reparación ósea, seguido de una diferenciación de Ob mediada por factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1). Sin embargo, a dosis persistentemente elevadas, el TGFβ puede inhibir la diferenciación de Ob mediante la represión del factor de diferenciación RUNX2. Dados los efectos cruciales sobre la interacción Oc/Ob, el ajuste fino de la disponibilidad de TGFβ es un factor clave para el acoplamiento local de la resorción ósea con la formación durante la remodelación ósea, y su desequilibrio puede conducir a una patología ósea significativa.

Al contrario de lo observado en ratones *Crtp^{-/-}* de control, las secciones óseas de ratones *Crtp^{-/-}* tratados con 1D11 reveló una reducción de los números de Oc y Ob, que fueron incluso menores que los valores medidos en ratones WT, lo que indica una supresión suprafisiológica de la remodelación ósea desregulada como resultado de la inhibición de TGFβ a la dosis de 1D11 usada en este experimento (Figura 11C). En consistencia con una publicación previa, la observación de una reducción de Oc's y Ob's por debajo de los niveles WT también puntúa a la baja el requisito fisiológico de cantidades locales de TGFβ para coordinar de forma normal los Oc's y los Ob's durante el proceso de remodelación ósea. Nuestros descubrimientos difieren de estudios previos en ratones WT, donde el tratamiento con 1D11 redujo los números de Oc pero no los de Ob. Esto puede reflejar efectos celulares distintos de la inhibición de TGFβ en una situación patofisiológica con un aumento de la señalización de TGFβ y un aumento de la remodelación ósea en comparación con el hueso normal de ratones WT. Se ha demostrado que el TGFβ inhibe la diferenciación de células precursoras de osteoblastos, y un aumento de la señalización de TGFβ podría de este modo conducir a una mayor proporción de células de linaje de osteoblasto inmaduras. Por otro lado, un aumento del número, o una mayor proporción, de Ob's inmaduros sobre la superficie ósea podría dar como resultado un aumento de la cantidad de TGFβ secretado por dichas células. El descubrimiento de que la inhibición de TGFβ con 1D11 reduce significativamente el aumento del número de Ob en ratones *Crtp^{-/-}* sugiere que el aumento de la señalización de TGFβ contribuye

causalmente al aumento de las células de linaje de osteoblasto.

Además de los descubrimientos relativos a los números de Oc y Ob, se observó un mayor número de osteocitos (Ot) por área ósea en los ratones *Crtap*^{-/-} de control, que se redujo a niveles comparables a los de ratones WT en los ratones *Crtap*^{-/-} tratados con 1D11 (Figura 11C y Figura 21). En pacientes de OI, se ha observado un aumento de la densidad de Ot en individuos con las formas más graves de la enfermedad, lo que probablemente refleja la presencia de hueso primario inmaduro debido a un defecto en la maduración fisiológica en el hueso de OI. En consistencia con nuestra hipótesis de que un aumento de la señalización de TGFβ contribuye a la patología ósea en la OI, la sobreexpresión de TGFβ en ratones WT da como resultado de forma similar un aumento de la densidad de Ot. Como posible explicación, el TGFβ puede inhibir la apoptosis de Ob durante la transición de Ob's a Ot's, y con ello conducir a un aumento de la densidad de Ot. En conjunto, estos descubrimientos indican que el aumento de la señalización de TGFβ contribuye a un estatus de mayor tasa de recambio ósea y a una maduración ósea afectada negativamente en ratones *Crtap*^{-/-}, y que la inhibición de la señalización de TGFβ desregulada revierte dichas alteraciones celulares.

Dados estos efectos cruciales sobre la interacción Oc/Ob, el ajuste fino de la disponibilidad de TGFβ es un factor clave para el acoplamiento local de la resorción ósea con la formación de hueso durante la remodelación ósea, y su desequilibrio puede conducir a una patología ósea significativa. Nuestros descubrimientos indican que la inhibición de la señalización de TGFβ desregulada en ratones *Crtap*^{-/-} restaura tanto la masa ósea como los parámetros microestructurales, mejora la resistencia general del hueso y revierte las alteraciones celulares observadas en ratones *Crtap*^{-/-}. Por lo tanto, la desregulación de la señalización de TGFβ es un contribuyente importante al fenotipo óseo en este modelo de ratón de OI recesiva.

También estábamos interesados en determinar si la inhibición de TGFβ afectaba al fenotipo pulmonar de ratones *Crtap*^{-/-}. Los pulmones de ratones *Crtap*^{-/-} de control muestran un incremento del espacio aéreo distal en comparación con los ratones WT (Figura 11D). Cabe destacar que los pulmones de ratones *Crtap*^{-/-} tratados con el anticuerpo neutralizante de TGFβ mostraron una mejoría del 60% en la distancia entre las estructuras alveolares (Figuras 11D y 11E). Este descubrimiento indica que una señalización de TGFβ excesiva también es un importante contribuyente patogénico a las anomalías pulmonares presentes en ratones *Crtap*^{-/-}. El aumento de la señalización de TGFβ se ha ligado a las anomalías pulmonares de desarrollo, así como a la enfermedad en pulmones maduros. Por ejemplo, la sobreexpresión de TGFβ en pulmones da como resultado un desarrollo alterado negativamente de los pulmones con áreas de espacio aéreo agrandadas, y el aumento de la señalización de TGFβ es un patomecanismo contribuyente en las anomalías pulmonares en el síndrome de Marfan, así como en el desarrollo de enfisema y asma bronquial. Nuestros resultados indican que una señalización de TGFβ excesiva es un contribuyente patogénico importante a las anomalías pulmonares presentes en ratones *Crtap*^{-/-}. Dada la recuperación parcial del fenotipo pulmonar con 1D11 en ratones *Crtap*^{-/-}, es posible que la señalización de TGFβ desregulada afecte al desarrollo del tejido pulmonar cuando se establecen las estructuras anatómicas, además de mantener el tejido pulmonar en etapas posteriores cuando la inhibición de TGFβ es capaz de aliviar el fenotipo.

La siguiente cuestión a resolver fue cómo las alteraciones del colágeno debidas a la pérdida de *Crtap* (que conducen a la pérdida de 3Hyp en P986 y la sobre-modificación postraducciona de colágeno) dan como resultado una señalización de TGFβ desregulada. Los análisis bioquímicos indican que la prolil-3-hidroxilación del colágeno no afecta fundamentalmente a la estabilidad de las moléculas de colágeno, sino que en su lugar puede afectar a las interacciones colágeno-proteína. Una hipótesis atractiva es que la pérdida de 3Hyp podría afectar a la interacción del colágeno con proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP). Se sabe que SLRP se unen tanto a colágeno de tipo I como a TGFβ, y mediante ello modulan la actividad de TGFβ. Por ejemplo, el SLRP decorina es capaz de inhibir distintos efectos del TGFβ en células de osteosarcoma a la vez que potencia la actividad de TGFβ en células preosteoblásticas. Se sugiere que la región de unión de la decorina en el colágeno de tipo I está centrada en los residuos 961/962 del dominio de hélice triple, que está localizado en las proximidades del residuo P986, que está no hidroxilado en la OI debido a una deficiencia de *Crtap*. Por lo tanto, es posible que la posición 3Hyp del P986 marque un sitio de interacción para la unión de decorina a colágeno de tipo I, mediando de este modo en el secuestro de TGFβ maduro a colágeno.

Por tanto, se planteó la hipótesis de que la unión de decorina a colágeno es crítica para la regulación de TGFβ y que dicha unión se deshace con una estructura de colágeno alterada, por ejemplo mediante la pérdida de modificación de 3-prolil-hidroxilación postraducciona de P986 en la cadena α1 del colágeno de tipo I en el caso de OI recesiva. Se identificó que aunque la pérdida de *Crtap* no alteró la expresión de ARN de decorina y otros SLRP en el hueso de calvaria (Figura 12A), ni la abundancia cualitativa de decorina en el hueso trabecular (Figura 24), sí redujo la unión de proteína de núcleo decorina recombinante a colágeno de tipo I aislado de ratones *Crtap*^{-/-} frente a ratones WT (Figura 12B). Las medidas de análisis de resonancia de plasmón superficial de la unión de proteína de núcleo decorina recombinante a colágeno de tipo I de ratones WT y *Crtap*^{-/-} demostraron una reducción de la unión en ratones *Crtap*^{-/-} en las tres concentraciones evaluadas (Figura 23). Se realizaron tres réplicas técnicas para cada una de las concentraciones indicadas de decorina a partir de dos réplicas biológicas independientes (♦ réplica 1, ▲ réplica 2). Los resultados se muestran como el porcentaje de la media de WT (las barras indican la media por grupo). Las reducciones medias de la unión de decorina a colágeno de tipo I de *Crtap*^{-/-} a 3, 5 y 12 μM de decorina fueron de 28,5%, 33,5% y 38,1%, respectivamente.

Este descubrimiento sugiere que las alteraciones de interacciones colágeno-proteoglicanos pueden contribuir a la señalización de TGFβ desregulada en los huesos y otros tejidos ricos en colágeno en la OI. En base al requisito

publicado de unión decorina-colágeno para que la decorina reduzca de manera efectiva la bioactividad de TGF β , es posible que los defectos en el colágeno de OI conduzcan a una unión alterada de la decorina, y por tanto, de su capacidad para secuestrar TGF β en la matriz y modular las funciones de TGF β . Por lo tanto, la alteración de las interacciones proteoglicano-colágeno puede contribuir a una señalización de TGF β desregulada en el hueso y otros tejidos ricos en colágeno en la OI, incluso si no hay cambios importantes en los niveles de TGF β absolutos (Figura 24 y Figura 25). Esta idea se ve apoyada por el descubrimiento de que las mutaciones COL1A1 y COL1A2 en las formas más severas de la OI dominante se agrupan en regiones específicas conocidas por producir la unión de proteoglicanos, lo que apoya aún más la relevancia fisiológica de las interacciones proteoglicano-colágeno para una homeostasis ósea normal. Esto también implicaría que otros proteoglicanos que compiten con la decorina por el sitio de unión a colágeno también contribuyen a una actividad de TGF β desregulada, y que se podrían alterar mecanismos de señalización adicionales.

Debido al solapamiento clínico de algunas formas recesivas y dominantes de la OI en las que la estructura defectuosa de las fibras de colágeno conduce a huesos frágiles y manifestaciones extraesqueléticas, es posible que la desregulación de la señalización de TGF β sea un mecanismo de enfermedad patofisiológica común. Para analizar esta hipótesis, se investigó el estatus de la señalización de TGF β en un modelo de ratón de OI dominante. Ratones activados que portan una mutación G610C en el gen Col1a2 (Col1a2^{tm1.1Mcb}) fenocopian una forma moderada heredada dominantemente de la OI que había sido identificada originalmente en una población Amish. En muestras óseas de ratones Col1a2^{tm1.1Mcb}, se observó un aumento de la expresión de los genes diana de TGF β p21 y PAI-1, lo que indica una regulación al alza de la señalización de TGF β (Figura 13A). En consistencia, los análisis de inmunotransferencia de extractos óseos de ratones Col1a2^{tm1.1Mcb} también presentaron un aumento del ratio de pSmad2 activada/Smad2 total, similar a nuestra observación en los ratones Crtap^{-/-} (Figuras 13B y 13C).

Para evaluar si el aumento de la señalización de TGF β en este modelo de OI dominante también representa un mecanismo causal, ratones Col1a2^{tm1.1Mcb} de 8 semanas de edad fueron tratados con el anticuerpo neutralizante de TGF β 1D11 durante 8 semanas; ratones Col1a2^{tm1.1Mcb} de control y WT fueron tratados con el anticuerpo de control 13C4. De forma similar a lo observado con ratones Crtap^{-/-}, el tratamiento con 1D11 restauró los parámetros óseos trabeculares en la espina hasta los niveles WT (Figuras 13D, 13E y 22). Considerados en conjunto, estos descubrimientos indican que la señalización de TGF β desregulada también es un contribuyente importante para la patogénesis de las formas dominantes de la OI, y que la terapia anti-TGF β corrige el fenotipo óseo en la OI dominante.

Desde una perspectiva clínica-traducciona, los efectos negativos potenciales de la inhibición sistémica de TGF β en pacientes de OI deben ser considerados. Aunque los ratones TGF- β 1^{-/-} desarrollan una enfermedad inflamatoria multifocal severa y una desregulación del sistema inmunitario durante las primeras semanas de vida, tanto en ratones Crtap^{-/-} como en ratones Col1a2^{tm1.1Mcb} tratados con 1D11 nosotros no observamos efectos negativos obvios sobre la salud general, el comportamiento o el crecimiento, lo que sugiere que los efectos de una inhibición farmacológica parcial de los ligandos de TGF β en ratones adultos son diferentes de los de una pérdida total de TGF β 1 durante el desarrollo. En humanos, el Fresolimumab (GC1008, Genzyme), que es similar al 1D11 en su afinidad y especificidad con las 3 isoformas del TGF β , se usó en estudios de fase I en pacientes con glomeruloesclerosis segmental focal primaria resistente a tratamiento, fibrosis pulmonar idiopática y melanoma maligno o carcinoma de célula renal. En estos estudios, el Fresolimumab de forma general fue bien tolerado, con posibles eventos adversos relacionados con la dosis que incluyen sarpullidos o lesiones cutáneas, epistaxis, sangrado gingival y fatiga.

Los mecanismos moleculares de la OI no se comprenden completamente. Como resultado, las opciones de tratamiento actuales para pacientes con OI se limitan básicamente a terapias anti-resortivas como las usadas para el tratamiento de la osteoporosis. Cabe destacar que un ensayo aleatorio reciente, controlado por placebo, del agente anabólico teriparatide en adultos con OI demostró que la OI severa de tipo III/IV respondía de forma diferente que la OI moderada de tipo I (Orwoll et al. 2014). Esto sugiere diferencias genotípicas en la respuesta a terapias dirigidas a modificar la señalización celular y que el tratamiento dirigido a TGF β puede ser una opción prometedora para profundizar en el estudio de la OI severa debida a colágeno y a mutaciones genéticas de modificación postraducciona de colágeno. En general, nuestros datos apoyan el concepto de la señalización celular desregulada por matriz como mecanismo en la patogénesis de formas heredadas genéticamente diferentes de la enfermedad de huesos de cristal, y apuntan a una estrategia basada en el mecanismo específico de la enfermedad para el tratamiento de la OI a través de la neutralización de la actividad de TGF β hiperactivo en tejidos esqueléticos y extraesqueléticos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENZYME CORPORATION
BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE

5

<120> MÉTODOS PARA TRATAR LA OSTEOGÉNESIS IMPERFECTA

<130> BET 17M4011

10

<150> 61/883,151
<151> 26-10-2013

<150> 61/875,399
<151> 09-09-2013

15

<150> 61/803,647
<151> 20-03-2013

<160> 21

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 390

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
20 25 30

Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
35 40 45

Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
50 55 60

Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
85 90 95

Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
100 105 110

Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
115 120 125

30

His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
130 135 140

ES 2 763 869 T3

Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu
145 150 155 160

Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn
165 170 175

Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser
180 185 190

Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu
195 200 205

Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser
210 215 220

Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr
225 230 235 240

Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg Pro
245 250 255

Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu Gln
260 265 270

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
275 280 285

Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys
290 295 300

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn
305 310 315 320

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
325 330 335

Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala
340 345 350

Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr
355 360 365

Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
370 375 380

Arg Ser Cys Lys Cys Ser
385 390

<210> 2

5 <211> 414

<212> **PRT**

<213> Homo sapiens

<400> 2

10

ES 2 763 869 T3

Met	His	Tyr	Cys	Val	Leu	Ser	Ala	Phe	Leu	Ile	Leu	His	Leu	Val	Thr	1	5	10	15
Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Ser	Thr	Cys	Ser	Thr	Leu	Asp	Met	Asp	Gln	Phe	20	25	30	
Met	Arg	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Arg	Gly	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	35	40	45	
Lys	Leu	Thr	Ser	Pro	Pro	Glu	Asp	Tyr	Pro	Glu	Pro	Glu	Glu	Val	Pro	50	55	60	
Pro	Glu	Val	Ile	Ser	Ile	Tyr	Asn	Ser	Thr	Arg	Asp	Leu	Leu	Gln	Glu	65	70	75	80
Lys	Ala	Ser	Arg	Arg	Ala	Ala	Ala	Cys	Glu	Arg	Glu	Arg	Ser	Asp	Glu	85	90	95	
Glu	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Glu	Val	Tyr	Lys	Ile	Asp	Met	Pro	Pro	Phe	Phe	100	105	110	
Pro	Ser	Glu	Asn	Ala	Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Phe	Arg	115	120	125	
Ile	Val	Arg	Phe	Asp	Val	Ser	Ala	Met	Glu	Lys	Asn	Ala	Ser	Asn	Leu	130	135	140	
Val	Lys	Ala	Glu	Phe	Arg	Val	Phe	Arg	Leu	Gln	Asn	Pro	Lys	Ala	Arg	145	150	155	160
Val	Pro	Glu	Gln	Arg	Ile	Glu	Leu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Lys	Ser	Lys	Asp	165	170	175	
Leu	Thr	Ser	Pro	Thr	Gln	Arg	Tyr	Ile	Asp	Ser	Lys	Val	Val	Lys	Thr	180	185	190	
Arg	Ala	Glu	Gly	Glu	Trp	Leu	Ser	Phe	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Val	His	195	200	205	
Glu	Trp	Leu	His	His	Lys	Asp	Arg	Asn	Leu	Gly	Phe	Lys	Ile	Ser	Leu				

ES 2 763 869 T3

210

215

220

His Cys Pro Cys Cys Thr Phe Val Pro Ser Asn Asn Tyr Ile Ile Pro
225 230 235 240

Asn Lys Ser Glu Glu Leu Glu Ala Arg Phe Ala Gly Ile Asp Gly Thr
245 250 255

Ser Thr Tyr Thr Ser Gly Asp Gln Lys Thr Ile Lys Ser Thr Arg Lys
260 265 270

Lys Asn Ser Gly Lys Thr Pro His Leu Leu Leu Met Leu Leu Pro Ser
275 280 285

Tyr Arg Leu Glu Ser Gln Gln Thr Asn Arg Arg Lys Lys Arg Ala Leu
290 295 300

Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg
305 310 315 320

Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His
325 330 335

Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr
340 345 350

Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn
355 360 365

Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp
370 375 380

Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile
385 390 395 400

Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
405 410

<210> 3

<211> 412

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Lys Met His Leu Gln Arg Ala Leu Val Val Leu Ala Leu Leu Asn
1 5 10 15

10 Phe Ala Thr Val Ser Leu Ser Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe

ES 2 763 869 T3

20										25					30															
Gly	His	Ile	Lys	Lys	Lys	Arg	Val	Glu	Ala	Ile	Arg	Gly	Gln	Ile	Leu															
		35					40					45																		
Ser	Lys	Leu	Arg	Leu	Thr	Ser	Pro	Pro	Glu	Pro	Thr	Val	Met	Thr	His															
	50					55					60																			
Val	Pro	Tyr	Gln	Val	Leu	Ala	Leu	Tyr	Asn	Ser	Thr	Arg	Glu	Leu	Leu															
65					70				75					80																
Glu	Glu	Met	His	Gly	Glu	Arg	Glu	Glu	Gly	Cys	Thr	Gln	Glu	Asn	Thr															
				85					90					95																
Glu	Ser	Glu	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Glu	Ile	His	Lys	Phe	Asp	Met	Ile	Gln															
			100					105					110																	
Gly	Leu	Ala	Glu	His	Asn	Glu	Leu	Ala	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Ile	Thr															
		115					120					125																		
Ser	Lys	Val	Phe	Arg	Phe	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Lys	Asn	Arg	Thr															
	130					135					140																			
Asn	Leu	Phe	Arg	Ala	Glu	Phe	Arg	Val	Leu	Arg	Val	Pro	Asn	Pro	Ser															
145					150					155				160																
Ser	Lys	Arg	Asn	Glu	Gln	Arg	Ile	Glu	Leu	Phe	Gln	Ile	Leu	Arg	Pro															
			165					170					175																	
Asp	Glu	His	Ile	Ala	Lys	Gln	Arg	Tyr	Ile	Gly	Gly	Lys	Asn	Leu	Pro															
		180						185					190																	
Thr	Arg	Gly	Thr	Ala	Glu	Trp	Leu	Ser	Phe	Asp	Val	Thr	Asp	Thr	Val															
		195					200					205																		
Arg	Glu	Trp	Leu	Leu	Arg	Arg	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Ile	Ser															
	210				215					220																				
Ile	His	Cys	Pro	Cys	His	Thr	Phe	Gln	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Leu	Glu															
225					230					235				240																
Asn	Ile	His	Glu	Val	Met	Glu	Ile	Lys	Phe	Lys	Gly	Val	Asp	Asn	Glu															
			245					250					255																	
Asp	Asp	His	Gly	Arg	Gly	Asp	Leu	Gly	Arg	Leu	Lys	Lys	Gln	Lys	Asp															
		260					265						270																	

ES 2 763 869 T3

His His Asn Pro His Leu Ile Leu Met Met Ile Pro Pro His Arg Leu
275 280 285

Asp Asn Pro Gly Gln Gly Gly Gln Arg Lys Lys Arg Ala Leu Asp Thr
290 295 300

Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu
305 310 315 320

Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro
325 330 335

Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg
340 345 350

Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu
355 360 365

Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu
370 375 380

Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln
385 390 395 400

Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
405 410

<210> 4

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10

<400> 4

Ser Asn Val Ile Ser

1 5

15

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 5

25

Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

30

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Péptido sintético

<400> 6

Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 7

15 Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 7
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

25 <400> 8

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro
1 5

30 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 9

Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr
40 1 5

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

50 <400> 10

ES 2 763 869 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 Thr Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr 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 Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 327
<212> PRT

ES 2 763 869 T3

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

5 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

ES 2 763 869 T3

165

170

175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 13

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

10 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

ES 2 763 869 T3

50

55

60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 14

<211> 447

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 14

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 Thr Phe Ser Ser Asn
20 25 30

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

Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr 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 Ser Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

ES 2 763 869 T3

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 15
 <211> 215

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Polipéptido sintético

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

10

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <400> 16

ES 2 763 869 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser

- 5 <210> 17
- <211> 466
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Polipéptido sintético

<400> 17

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

- 15 Gln Arg Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser

ES 2 763 869 T3

85										90					95				
Thr	Thr	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val				
			100					105					110						
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ser	Thr	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr				
		115					120					125							
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly				
	130					135					140								
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser				
145					150					155					160				
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val				
				165					170					175					
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe				
			180					185					190						
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val				
		195					200					205							
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val				
	210					215					220								
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys				
225					230					235					240				
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly				
				245					250					255					
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile				
			260					265					270						
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu				
		275					280					285							
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His				
	290					295					300								
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg				
305					310					315					320				
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys				
				325					330					335					

ES 2 763 869 T3

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 18

<211> 234

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu
35 40 45

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

Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp

ES 2 763 869 T3

	65					70										75											80
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser 85	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 90	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile 95	Ser											
	Arg	Leu	Glu	Pro 100	Glu	Asp	Phe	Ala	Val 105	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln 110	Tyr	Ala											
	Asp	Ser	Pro 115	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln 120	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu 125	Ile	Lys	Arg											
	Thr	Val 130	Ala	Ala	Pro	Ser	Val 135	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro 140	Ser	Asp	Glu	Gln											
	Leu 145	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala 150	Ser	Val	Val	Cys	Leu 155	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr 160											
	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys 165	Val	Gln	Trp	Lys	Val 170	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln 175	Ser											
	Gly	Asn	Ser	Gln 180	Glu	Ser	Val	Thr	Glu 185	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp 190	Ser	Thr											
	Tyr	Ser 195	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr 200	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp 205	Tyr	Glu	Lys											
	His 210	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu 215	Val	Thr	His	Gln	Gly 220	Leu	Ser	Ser	Pro											
	Val 225	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn 230	Arg	Gly	Glu	Cys																	
5	<210>	19																									
	<211>	16																									
	<212>	PRT																									
	<213>	Mus sp.																									
10	<220>																										
	<221>	RES_MOD																									
	<222>	(7)..(7)																									
	<223>	Pro hidroxilada																									
15	<220>																										
	<221>	RES_MOD																									
	<222>	(12)..(12)																									
	<223>	Pro 3-hidroxilada																									
20	<220>																										
	<221>	RES_MOD																									
	<222>	(13)..(13)																									
	<223>	Pro hidroxilada																									
	<400>	19																									
25	Asp 1	Gly	Leu	Asn 5	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Ile 10	Gly																

<212> PRT
 <213> Mus sp.

 <220>
 5 <221> RES_MOD
 <222> (7)..(7)
 <223> Pro hidroxilada

 <220>
 10 <221> RES_MOD
 <222> (13)..(13)
 <223> Pro hidroxilada

 <400> 20
 15 Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg
 1 5 10 15

 <210> 21
 <211> 16
 20 <212> PRT
 <213> Mus sp.

 <220>
 <221> RES_MOD
 25 <222> (7)..(7)
 <223> Pro hidroxilada

 <220>
 <221> RES_MOD
 30 <222> (13)..(13)
 <223> Pro hidroxilada

 <400> 21
 35 Asp Gly Leu Asn Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a, y neutraliza, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 para uso en un método para tratar la osteogénesis imperfecta (OI) en un sujeto humano que lo necesita en combinación con un bisfosfonato,
5 donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
10
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es alendronato.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es pamidronato.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es zoledronato.
15
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es risedronato.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es etidronato.
20
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es clodronato.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es tiludronato.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es neridronato.
25
11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el bisfosfonato es olpadronato.
12. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a, y neutraliza, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3 para uso en un método para tratar la osteogénesis imperfecta (OI) en un sujeto humano que lo necesita en combinación con teriparatide,
30 donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
35

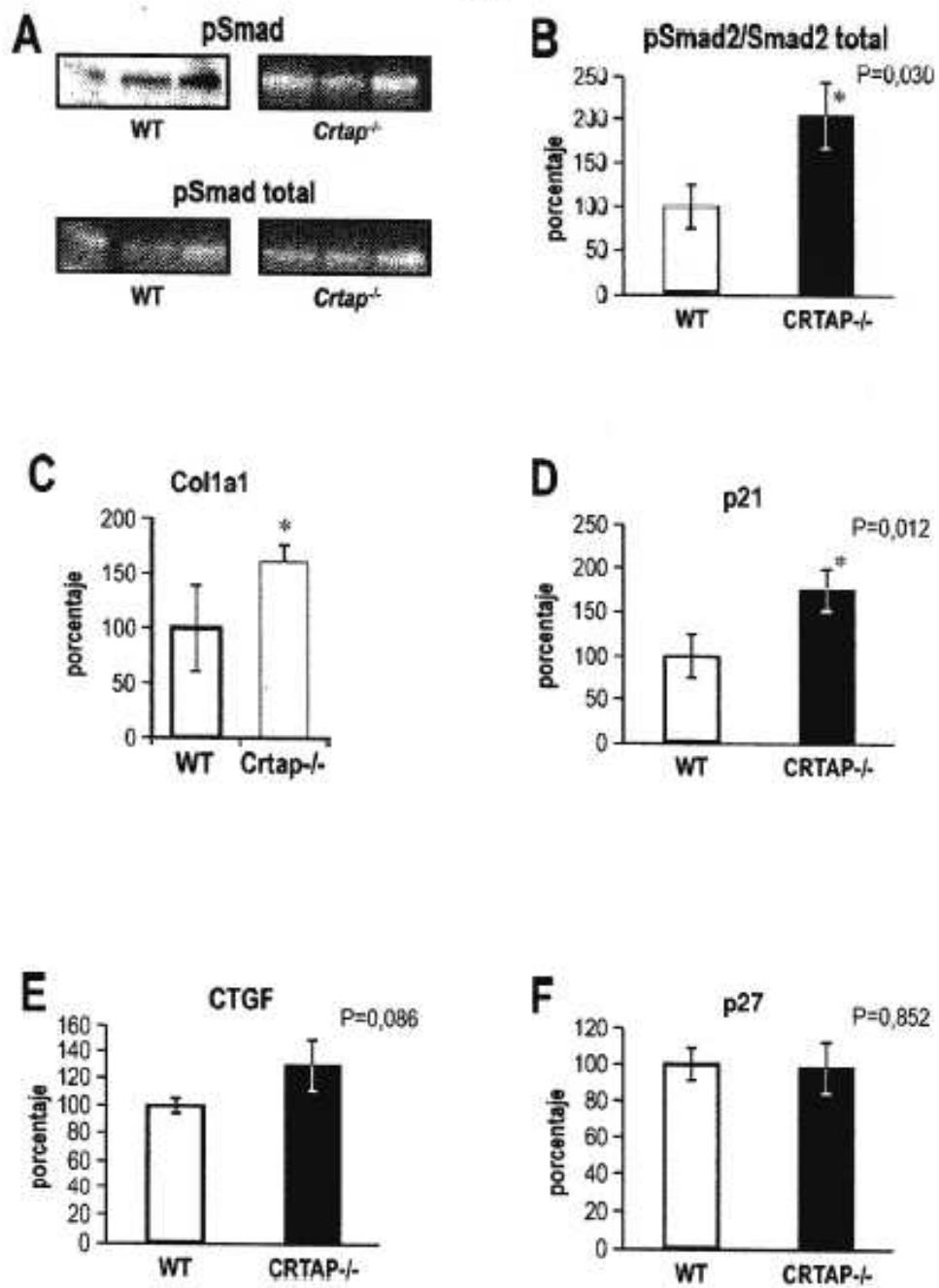
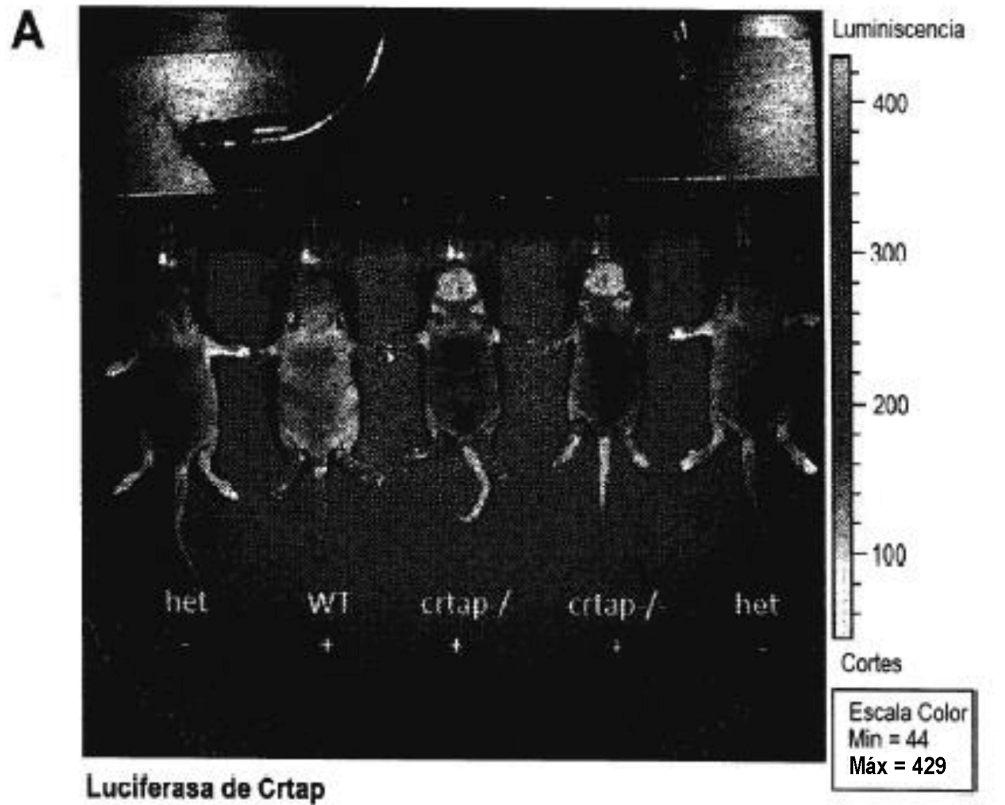
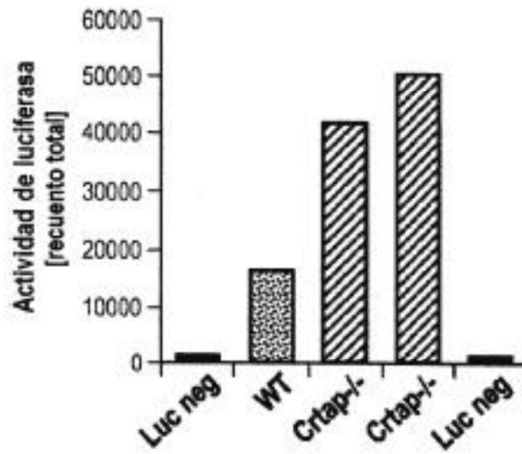


Fig. 1



B Actividad indicadora de TGFb



C Actividad indicadora de TGFb

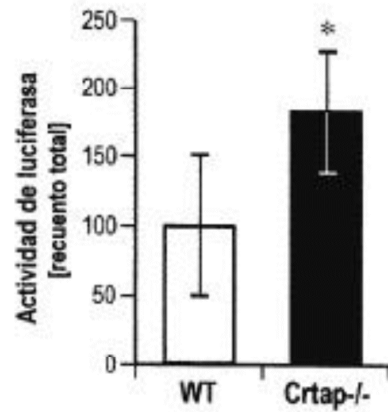


Fig. 2

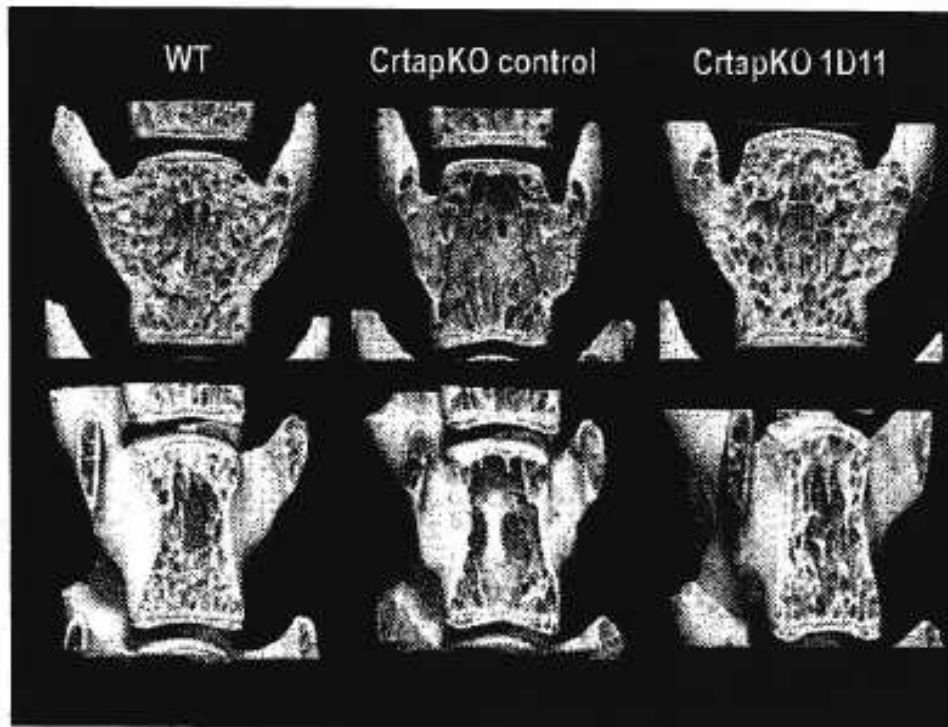


Fig. 3

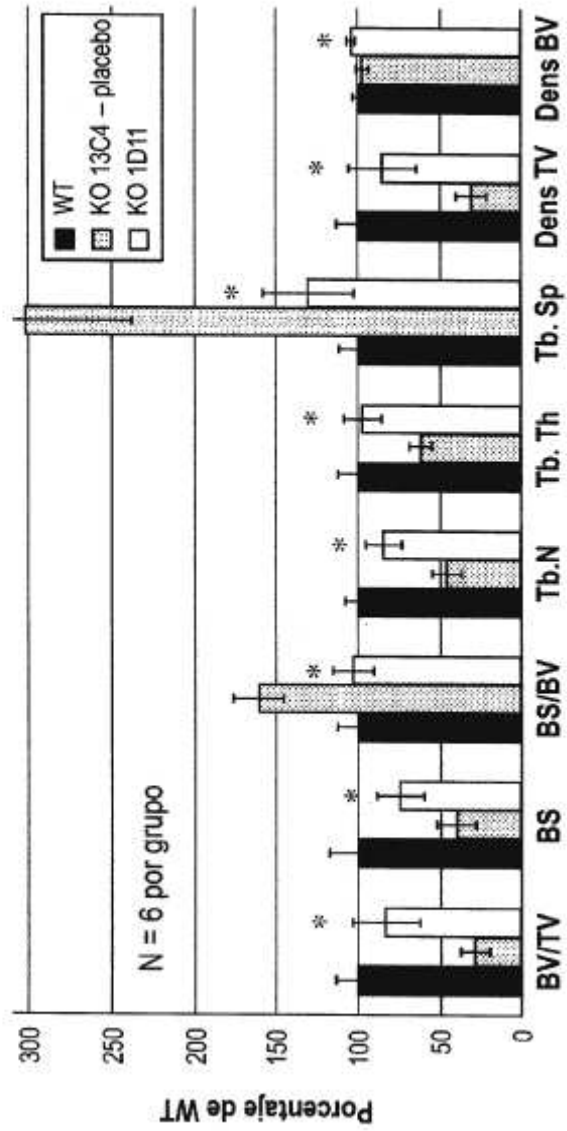


Fig. 4

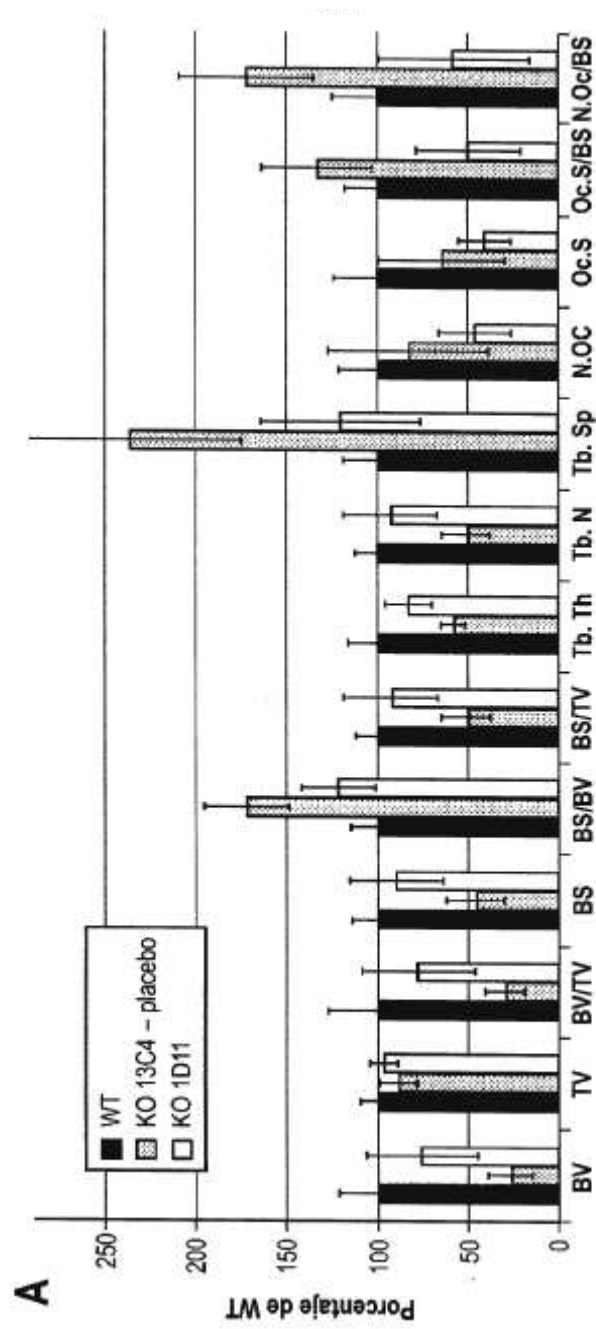


Fig. 5

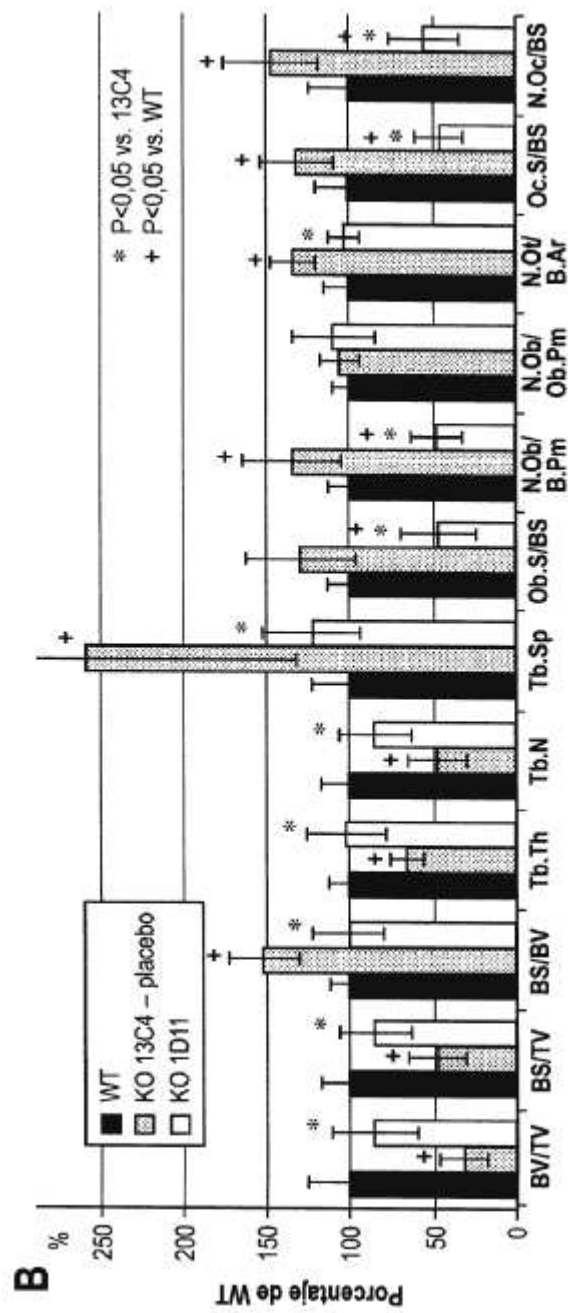


Fig. 5

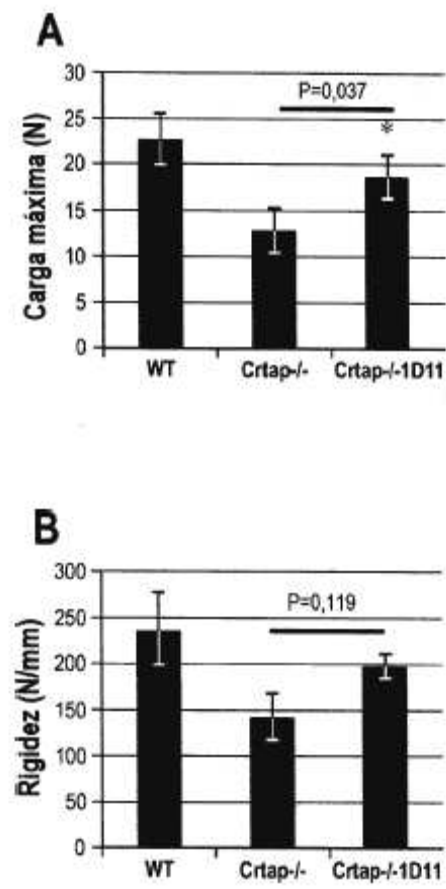


Fig. 6

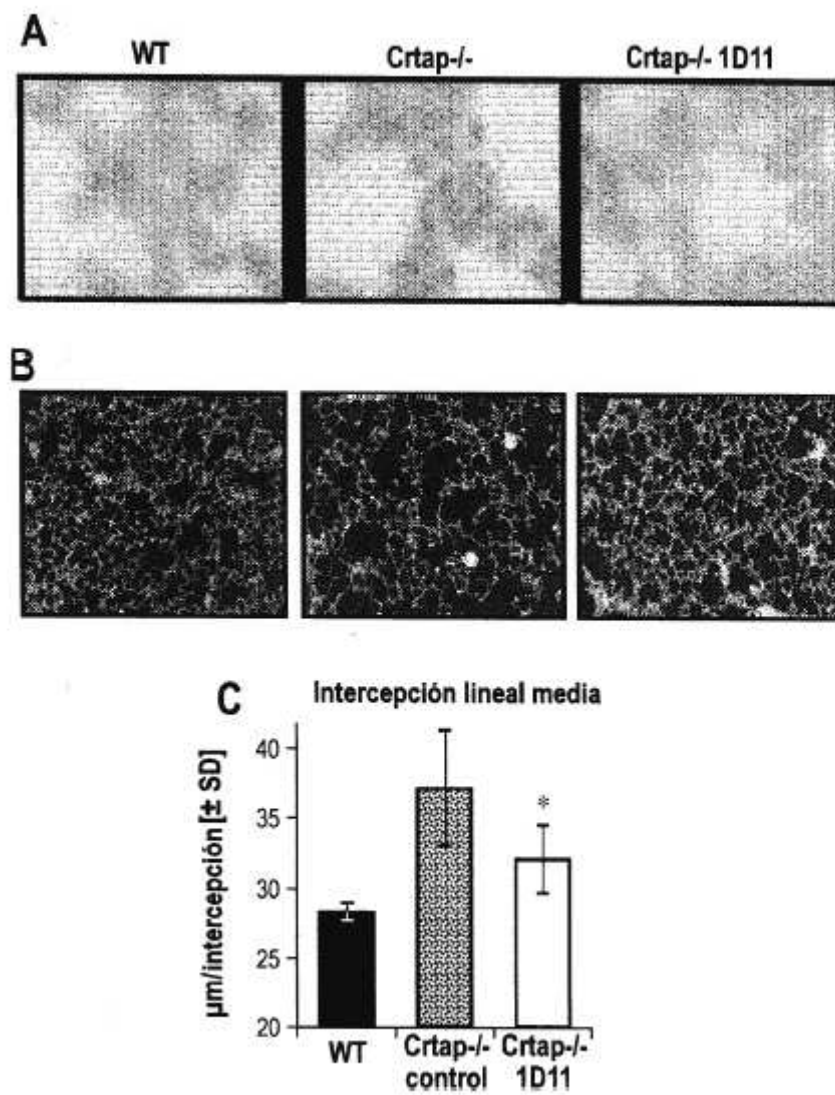


Fig. 7

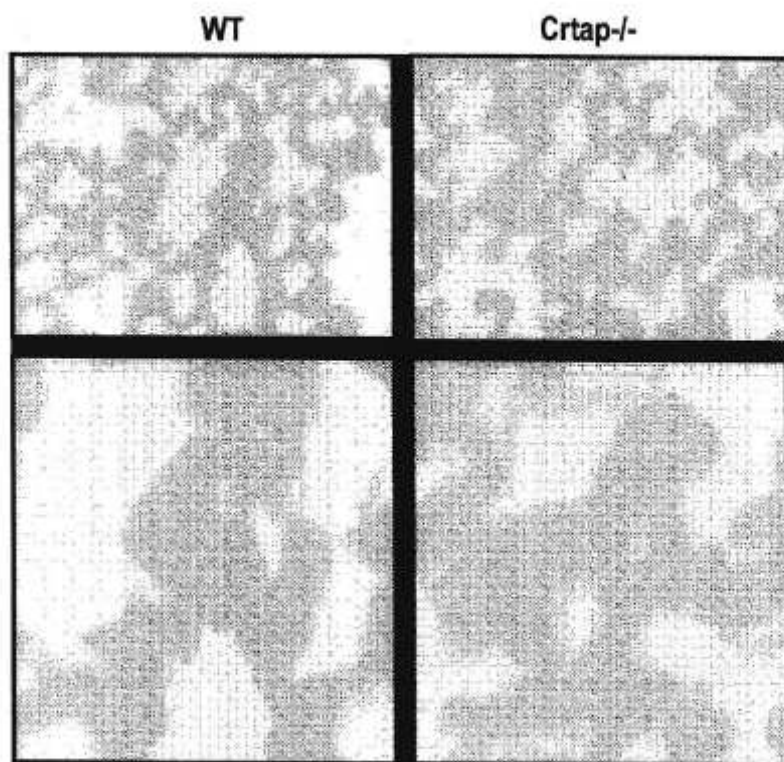


Fig. 8

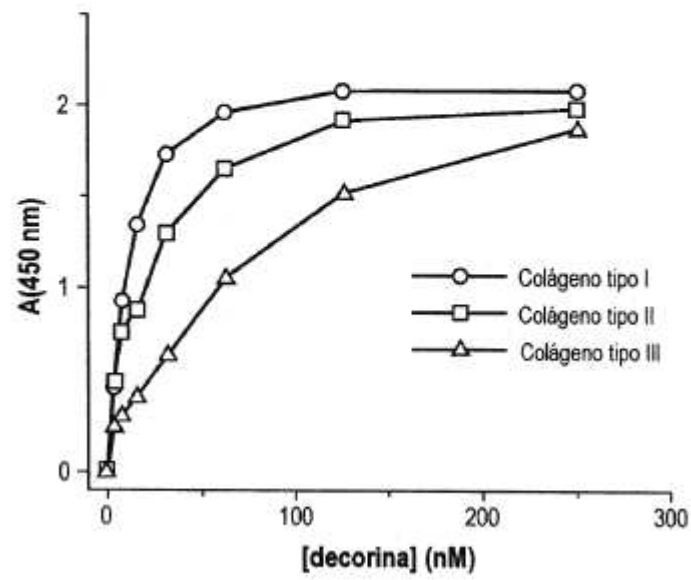


Fig. 9

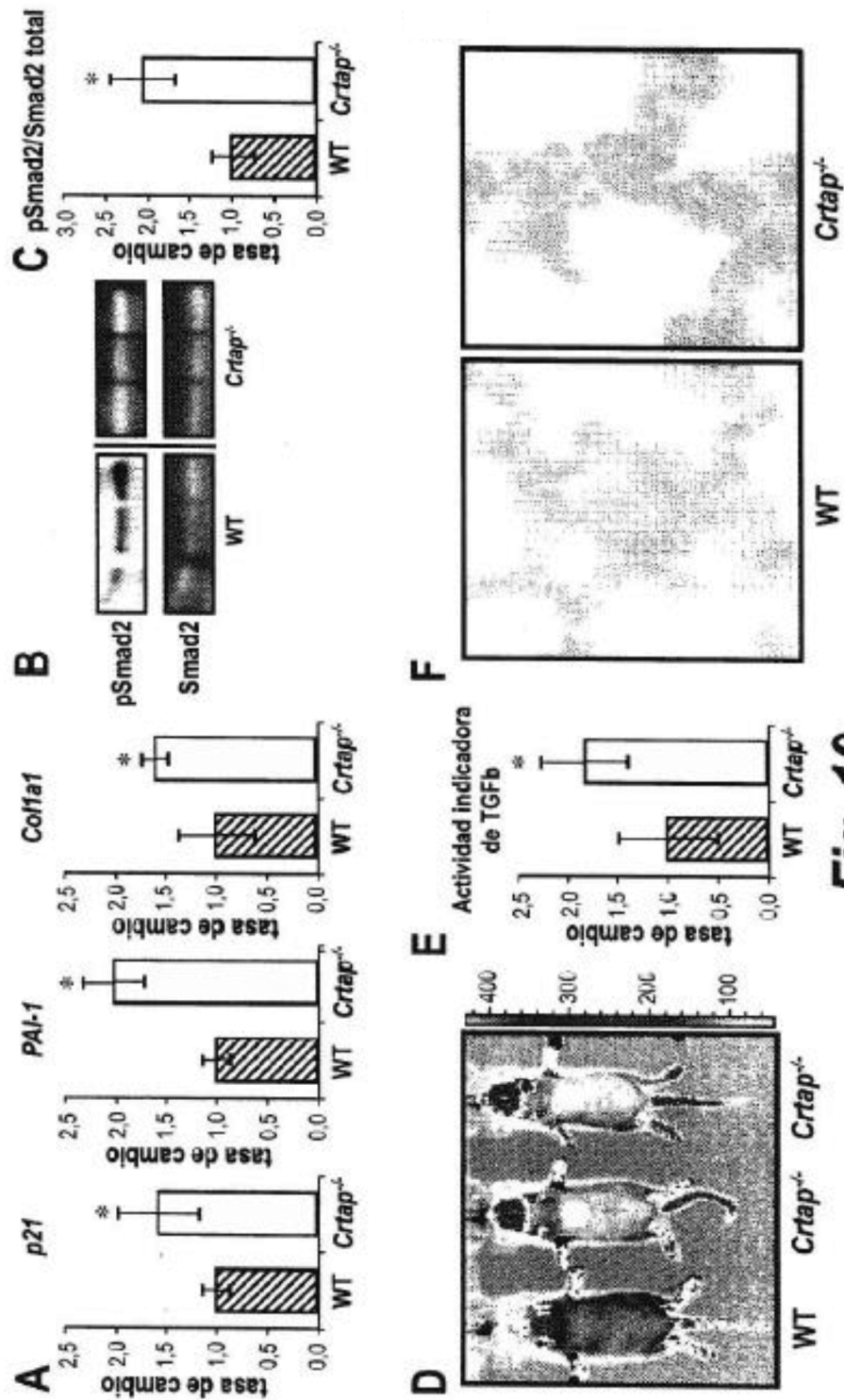


Fig. 10

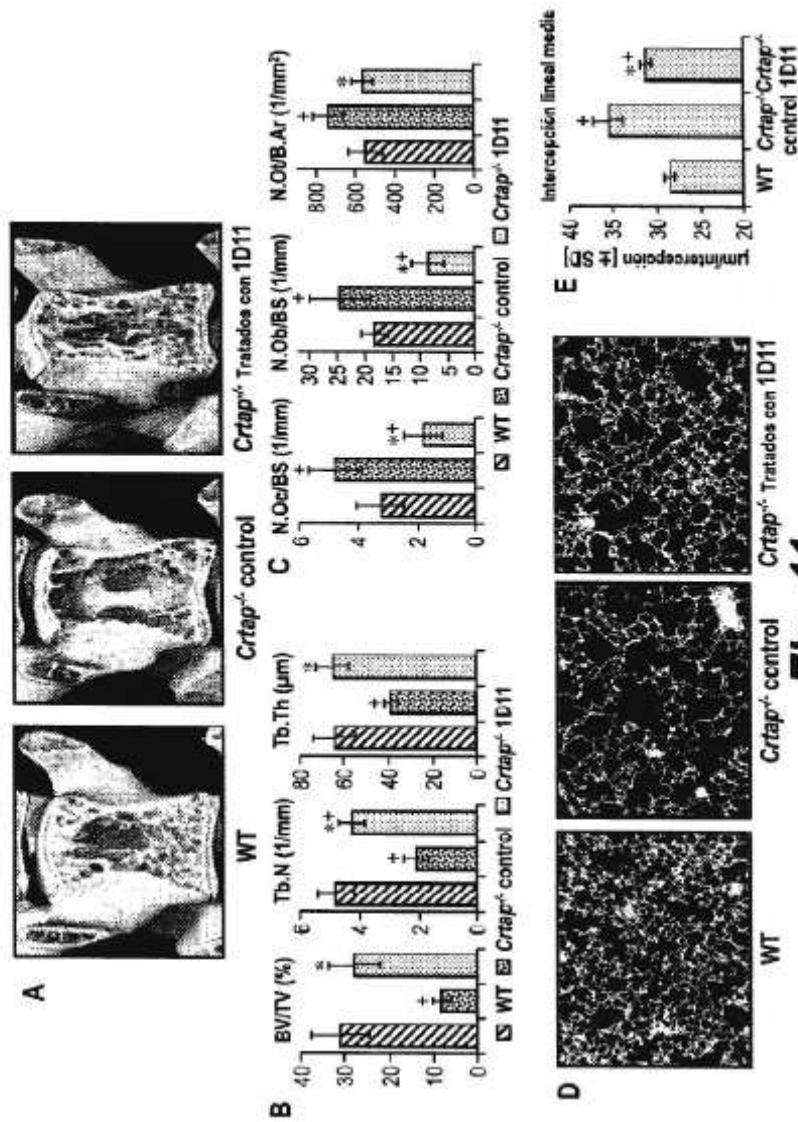


Fig. 11

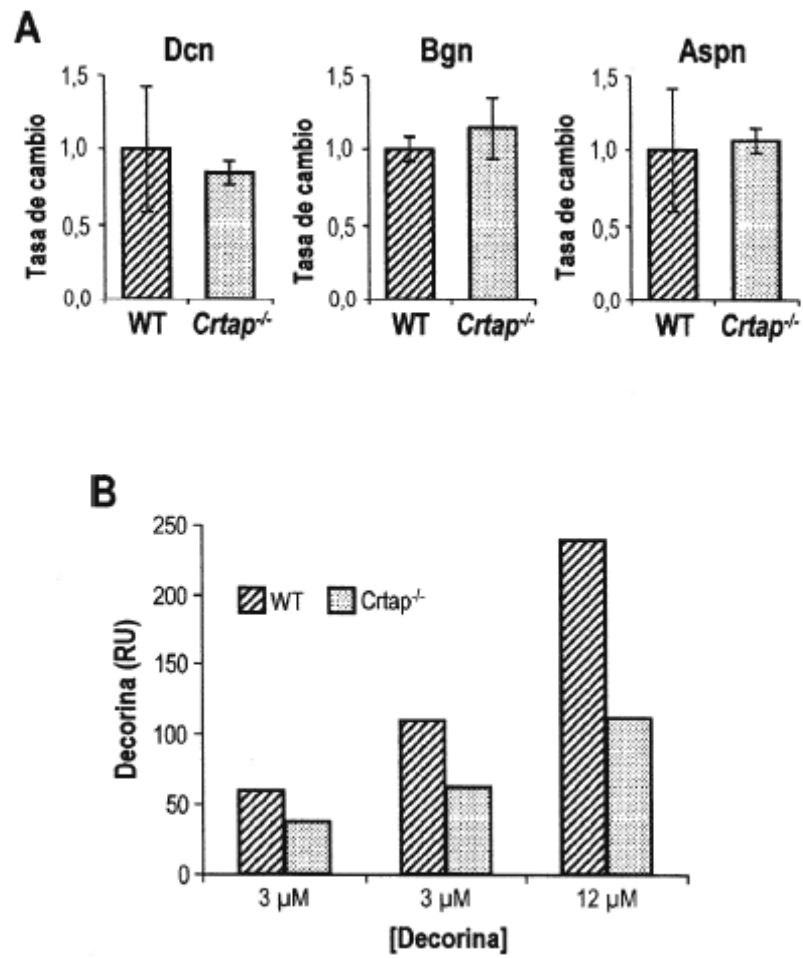


Fig. 12

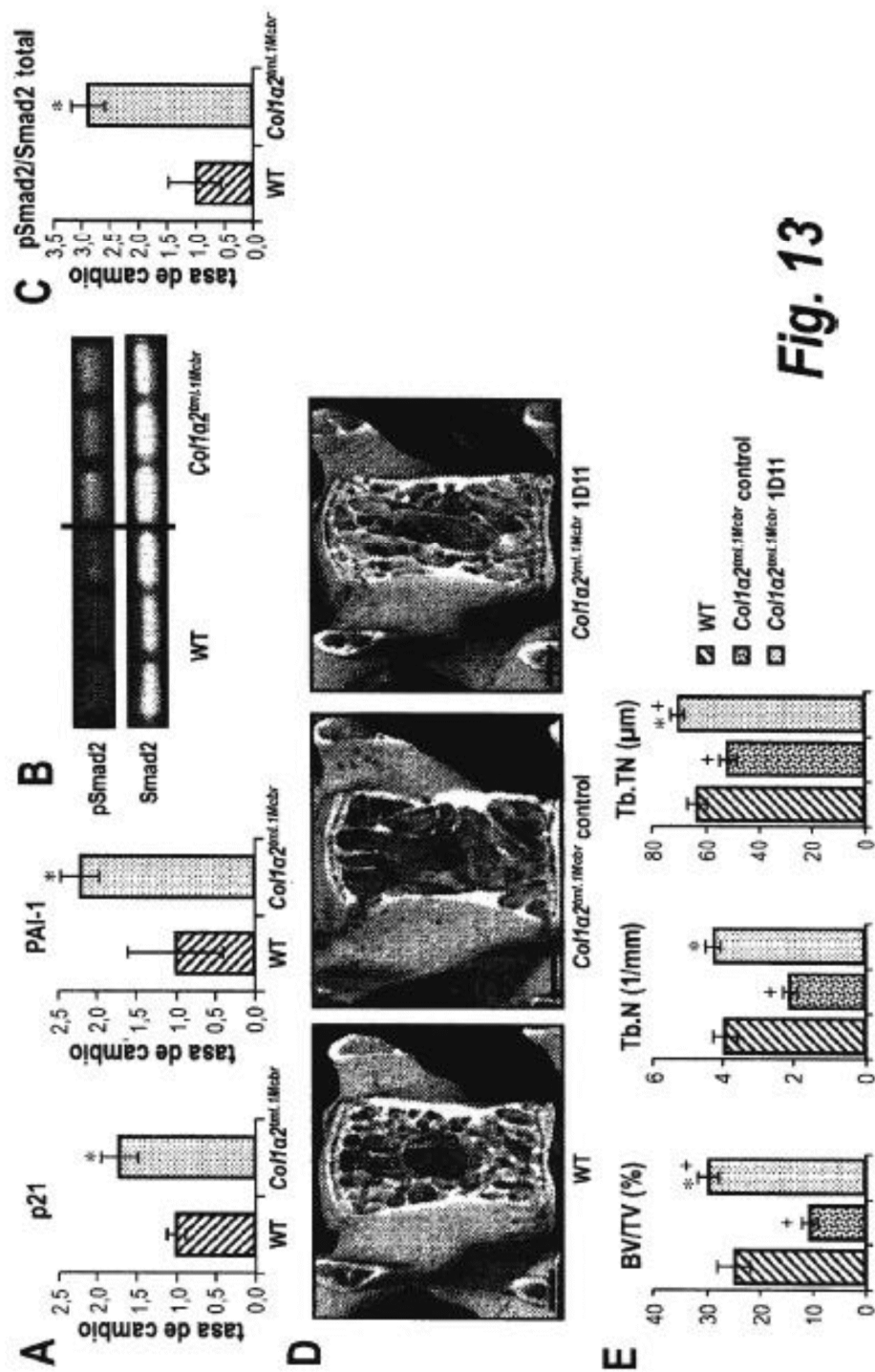


Fig. 13

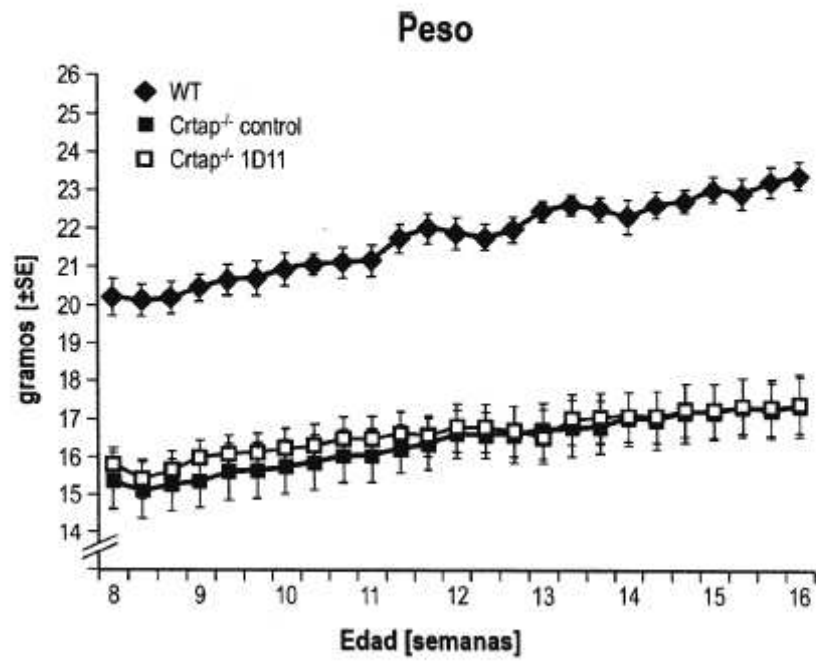


Fig. 14

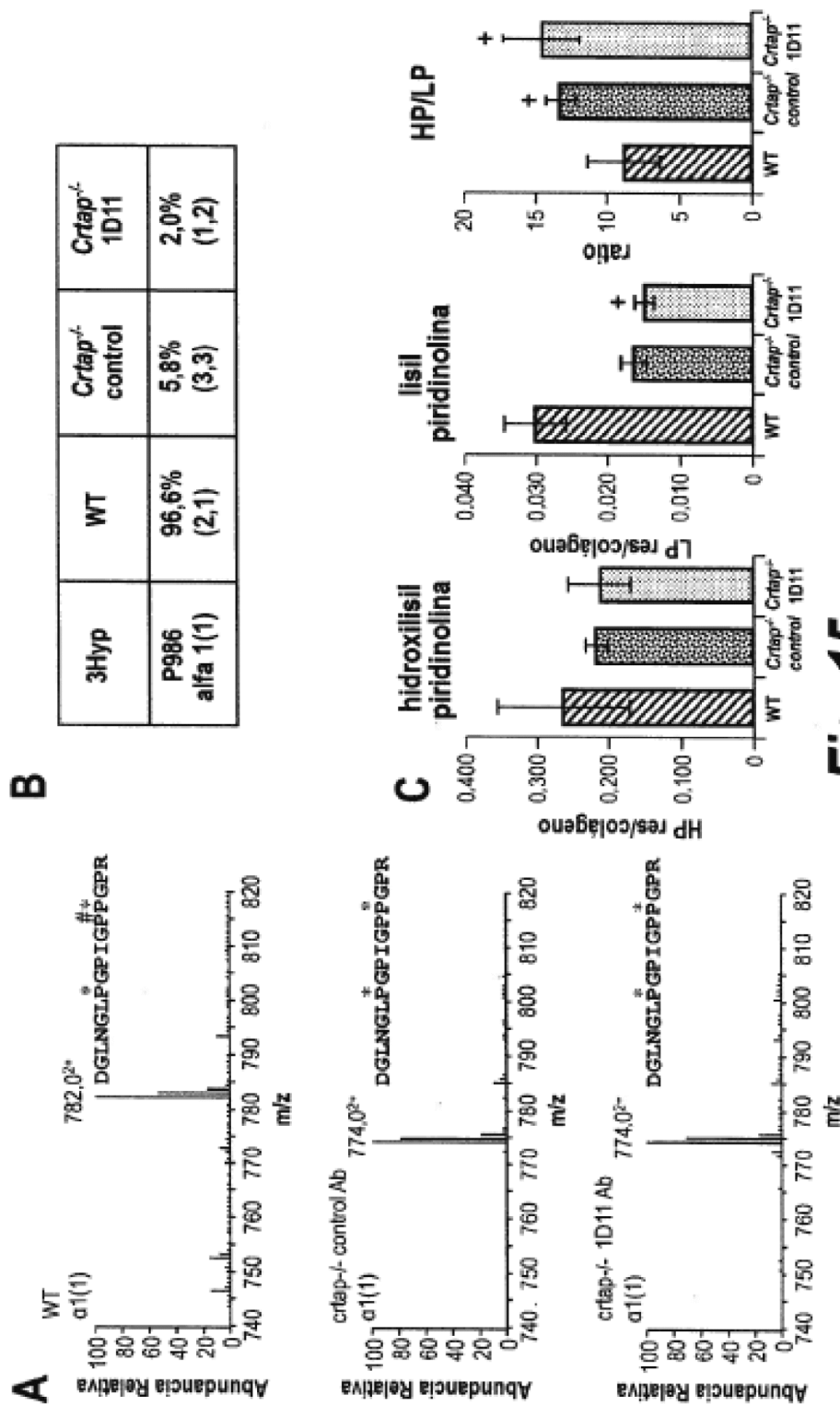


Fig. 15

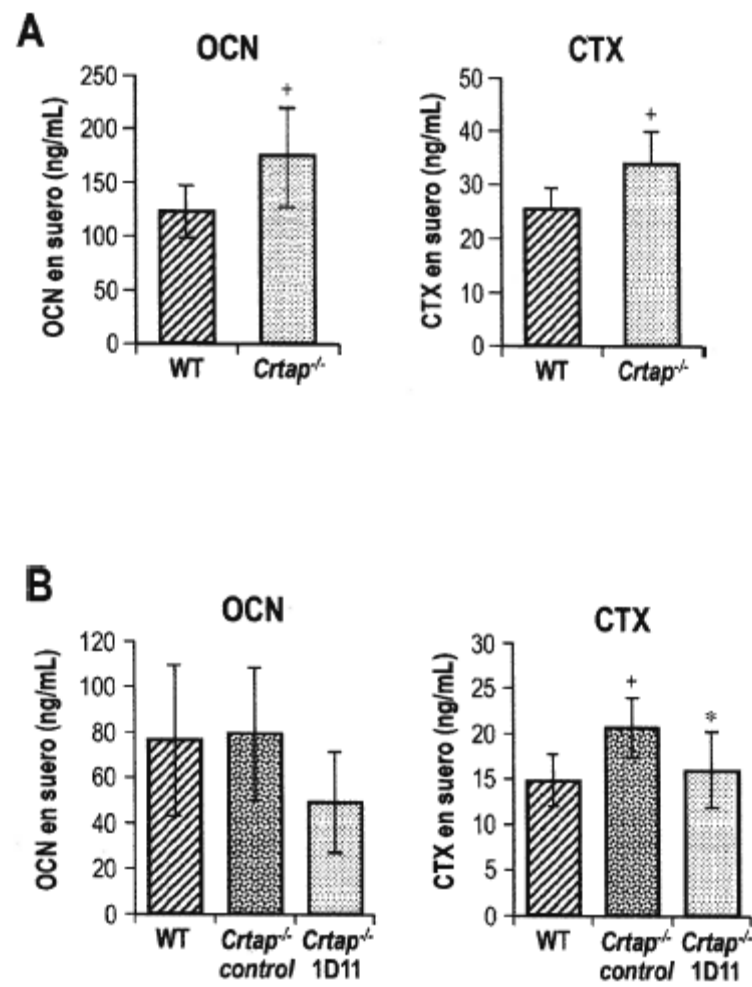


Fig. 16

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)
Tipo Natural (WT)	0.312	4.845	63.988	0.145	703.189
SD	0.065	0.583	9.482	0.034	19.014
<i>Crtap</i>^{-/-} control	0.084	2.130	38.888	0.450	677.416
SD	0.020	0.409	2.931	0.118	16.138
<i>Crtap</i>^{-/-} 1D11	0.280	4.290	64.650	0.171	746.862
SD	0.056	0.435	7.407	0.030	26.564
Valor P ANOVA	<0.001	<0.001	<0.001*	<0.001*	<0.001
Valores P por pares					
Tipo natural (WT) vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} control	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	0.023
Tipo natural (WT) vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.	0.031	n.s.	n.s.	<0.001
<i>Crtap</i> ^{-/-} control vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.001

Fig. 17

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)
Tipo Natural (WT)	0,107	2,808	37,413	0,341	733,864
SD	0,036	0,684	5,071	0,108	25,997
<i>Crtap</i>^{-/-} control	0,029	0,861	32,863	1,209	727,151
SD	0,011	0,237	3,428	0,345	28,765
<i>Crtap</i>^{-/-} 1D11	0,123	2,953	40,663	0,323	756,539
SD	0,045	0,767	5,842	0,121	36,913
Valor P ANOVA	<0,001⁺	<0,001⁺	0,015	<0,001	0,162
Valores P por pares					
Tipo natural (WT) vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} control	<0,05	<0,05	n.s.	<0,001	
Tipo natural (WT) vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
<i>Crtap</i> ^{-/-} control vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	<0,05	<0,05	0,004	<0,001	

Fig. 18

	Espesura cortical (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)	Diámetro a.p. (mm)	CSA (mm ²)	CSMI m.l. (mm ⁴)	CSMI a.p. (mm ⁴)
Tipo selvagem						
SD						
	0,242	1084,726	1,239	0,905	0,134	0,221
	0,014	28,375	0,063	0,079	0,023	0,042
Control de Crtap -/-						
SD						
	0,203	1084,885	1,142	0,731	0,101	0,162
	0,020	34,256	0,065	0,082	0,021	0,034
1D11 de Crtap -/-						
SD						
	0,221	1096,127	1,186	0,808	0,111	0,186
	0,026	39,754	0,080	0,118	0,028	0,038
Valor de p ANOVA	0,003	0,753	0,039	0,005	0,032	0,021
Valores de P por pares						
Tipo selvagem vs. Control de Crtap -/-	<0,001		0,012	0,001	0,011	0,006
Tipo selvagem vs. 1D11 de Crtap -/-	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Control de Crtap -/- vs. 1D11 de Crtap -/-	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Fig. 19

	Carga máxima (N)	Rigidez (N/mm)	Energía a fallo (N*mm)	Resistencia final (MPa)	Resistencia a fallo (MPa)	Módulo elástico (GPa)	Desplazamiento total (mm)	Desplazamiento elástico (mm)	Desplazamiento post-límite (mm)
Tipo Natural (WT)	22,831	230,578	7,846	154,704	11,912	6,960	0,444	0,068	0,376
SD	2,860	37,053	3,995	7,478	5,695	0,731	0,207	0,014	0,203
Crtap ^{+/+} control	12,943	151,689	1,228	114,496	2,208	6,663	0,127	0,079	0,048
SD	2,402	27,384	0,913	18,240	1,677	1,154	0,057	0,006	0,058
Crtap ^{-/-} 1D11	18,818	200,804	1,991	145,533	3,408	7,248	0,156	0,073	0,083
SD	2,337	15,644	0,834	19,074	1,851	0,271	0,055	0,013	0,055
Valor P ANOVA	<0,001	0,009	0,009	0,004	0,009	0,658	0,015	0,360	0,012
Valores P por pares									
Tipo natural vs. Crtap ^{+/+} control	<0,001	0,003	0,005	0,001	0,005		0,009		0,007
Tipo natural vs. Crtap ^{+/+} 1D11	n.s.	n.s.	0,017	n.s.	0,017		0,023		0,019
Crtap ^{+/+} control vs. Crtap ^{-/-} 1D11	0,015	n.s.	n.s.	0,016	n.s.		n.s.		n.s.

Fig. 20

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (μ m)	N.Oc/BS (1/mm)	Oc.S/BS (%)	N.Ob/BS (1/mm)	Ob.S/BS (%)	N.Ot/BAr (1/mm ²)
Tipo Natural (WT)	11,956	4,003	29,554	226,736	3,226	15,051	18,142	20,827	549,002
SD	3,067	0,656	3,536	50,077	0,812	3,089	2,368	2,754	83,665
<i>Crtap</i> ^{-/-} control	3,817	1,909	19,502	587,008	4,768	19,885	24,487	26,888	735,561
SD	1,656	0,692	2,560	289,835	0,914	3,407	5,421	6,983	72,617
<i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	10,203	3,411	30,182	277,886	1,772	6,829	8,638	9,748	555,044
SD	3,097	0,878	6,982	69,118	0,673	2,235	2,855	4,718	51,014
Valor P ANOVA	<0,001	<0,001	0,002	0,003*	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Valores P por pares									
Tipo natural vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} control	<0,001	<0,001	0,002	<0,05	0,005	0,012	0,011	n.s.	<0,001
Tipo natural vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,007	<0,001	<0,001	0,002	n.s.
<i>Crtap</i> ^{-/-} control vs. <i>Crtap</i> ^{-/-} 1D11	<0,001	0,003	0,001	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fig. 21

	BV/TV (%)	Tb.N (1/mm)	Tb.Th (μ m)	Tb.Sp (mm)	BMD BV (mg HA/ccm)
Tipo Natural (WT)	0,247	3,939	62,533	0,193	716,669
SD	0,033	0,330	3,497	0,025	7,628
Col1a2 ^{tm1.1Mcb} control	0,106	2,071	51,067	0,435	731,436
SD	0,015	0,195	2,999	0,047	11,792
Col1a2 ^{tm1.1Mcb} 1D11	0,297	4,244	69,983	0,166	754,115
SD	0,020	0,199	2,329	0,013	7,844
Valor P ANOVA	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Valores P por pares					
Tipo natural vs. Col1a2 ^{tm1.1Mcb} control	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,015
Tipo natural vs. Col1a2 ^{tm1.1Mcb} 1D11	0,002	n.s.	<0,001	n.s.	<0,001
Col1a2 ^{tm1.1Mcb} control vs. Col1a2 ^{tm1.1Mcb} 1D11	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fig. 22

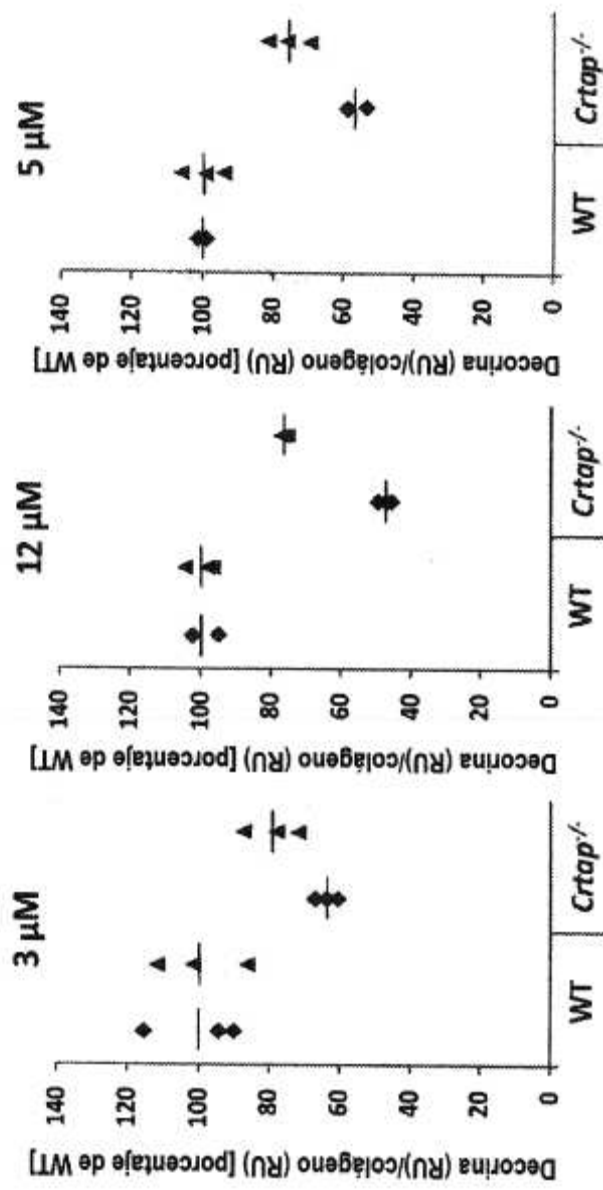
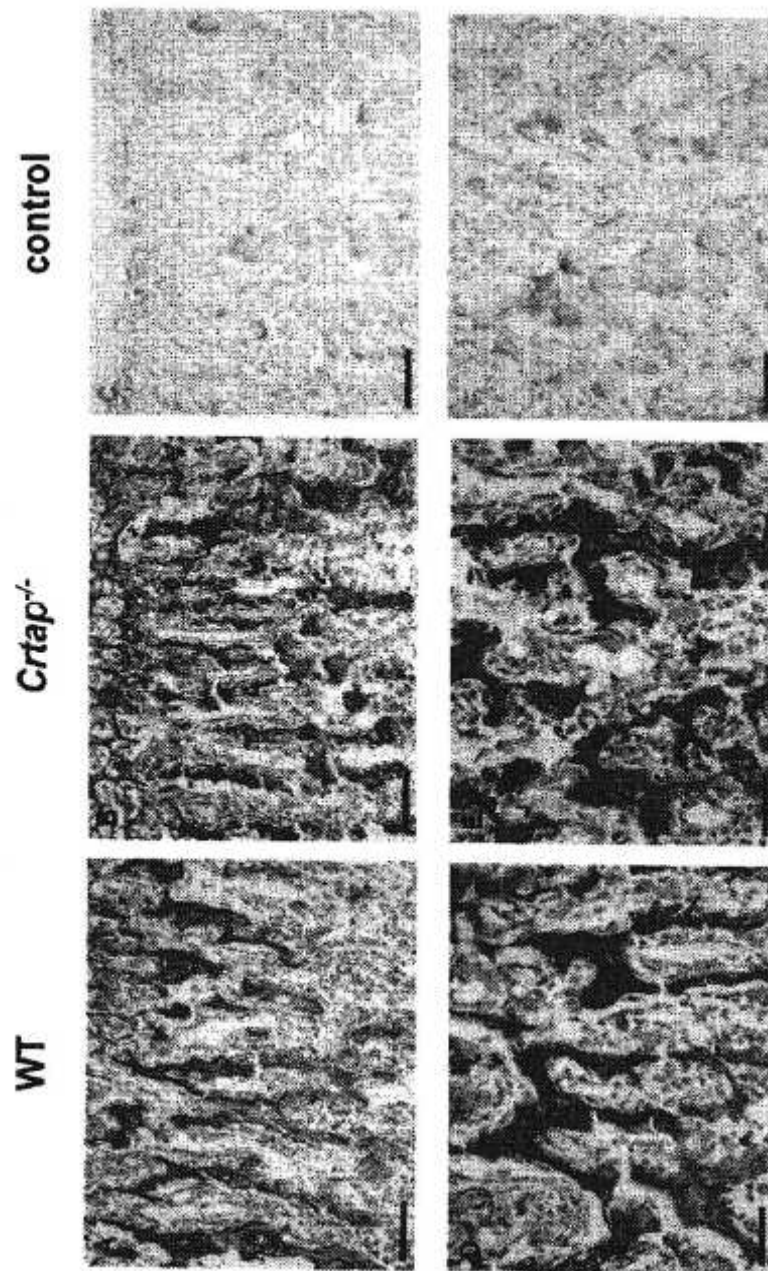


Fig. 23



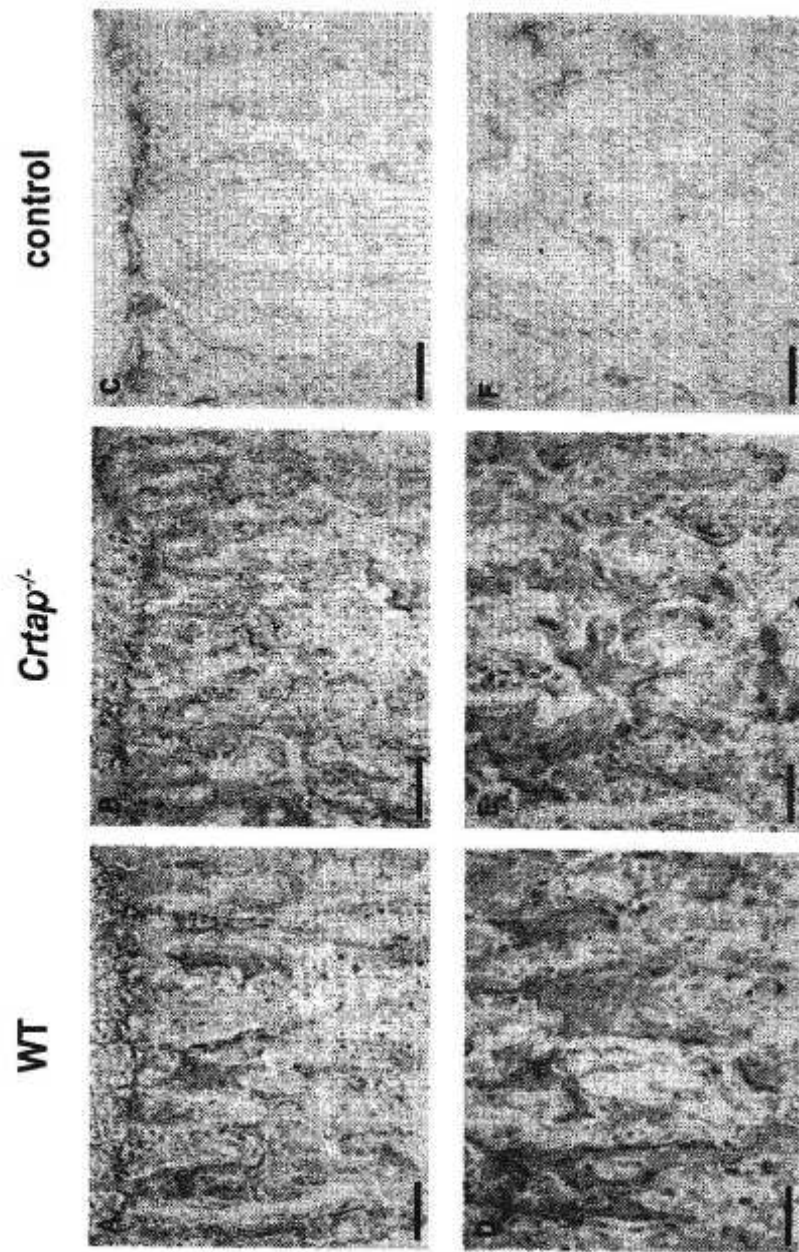


Fig. 25

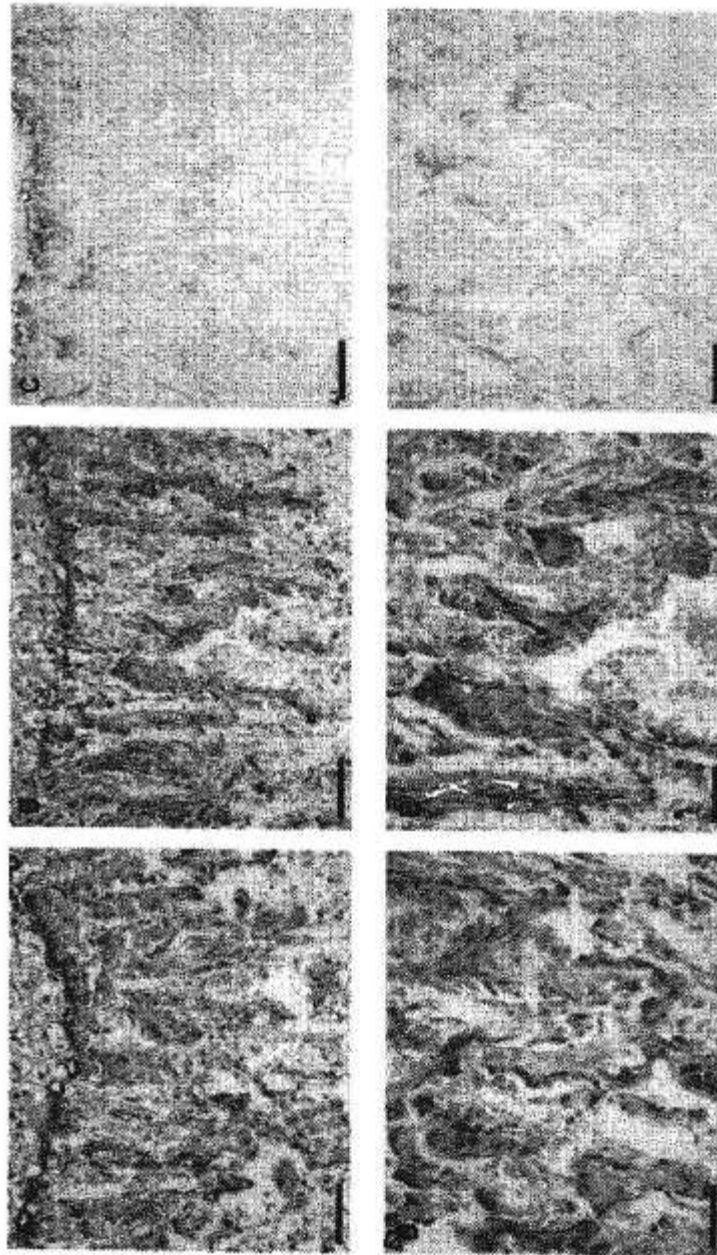


Fig. 26