

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 284 203**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12	(2006.01)	A61K 38/17	(2006.01)
C12N 15/11	(2006.01)	A61K 39/395	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C07K 14/705	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		
G01N 33/50	(2006.01)		
G01N 33/577	(2006.01)		
G01N 33/68	(2006.01)		
A61K 31/70	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.1998 E 98918244 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **06.01.2016 EP 0975754**

54

Título: **Proteínas de unión a osteoprotegerina y sus receptores**

30

Prioridad:

16.04.1997 US 842842
23.06.1997 US 880855
30.03.1998 US 52521

45

Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
11.03.2016

73

Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72

Inventor/es:

BOYLE, WILLIAM J.

74

Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 284 203 T5

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión a osteoprotegerina y sus receptores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a polipéptidos que están implicados en la diferenciación de osteoclastos. Más particularmente, la invención se refiere a proteínas de unión de osteoprotegerina, ácidos nucleicos que codifican las proteínas, vectores de expresión y células huésped para la producción de las proteínas, y ensayos de unión. También se describen composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades óseas, tales como osteoporosis, pérdida de masa ósea por artritis, enfermedad de Paget e hipercalcemia.

10 La invención también se refiere a receptores para proteínas de unión de osteoprotegerina y a métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades óseas usando los receptores.

Antecedentes de la invención

15 La vida del tejido óseo exhibe un equilibrio dinámico entre la creación de matriz ósea y la resorción ósea. Estos procesos están mediados principalmente por dos tipos de células: los osteoblastos, que secretan moléculas que comprenden la matriz orgánica del hueso; y los osteoclastos, que promueven la disolución de la matriz ósea y la solubilización de sales óseas. En individuos jóvenes con hueso en crecimiento, la velocidad de creación de matriz ósea supera la velocidad de resorción ósea, mientras que en individuos de mayor edad la tasa de resorción puede exceder a la de creación de matriz ósea. En la situación última, el aumento de la degradación del hueso conduce a una reducción de la masa y resistencia óseas, un aumento del riesgo de fracturas, y a una reparación lenta o incompleta de las fracturas.

20 Los osteoclastos son grandes células multinucleadas fagocitarias que se forman a partir de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea. Aunque el crecimiento y la formación de osteoclastos maduros funcionales no sean del todo comprendidos, se piensa que los osteoclastos maduran a lo largo del linaje celular monocito/macrófago en respuesta a la exposición a varios factores que promueven el crecimiento. El inicio del desarrollo de células precursoras de la médula ósea en preosteoclastos se piensa que es mediado por factores solubles tales como el factor- α de necrosis tumoral (TNF- β), el factor- β de necrosis tumoral (TNF- β), la interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-6 (IL-6), y el factor inhibidor de la leucemia (LIF). En cultivo, los preosteoclastos se forman en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) añadido. Estos factores actúan principalmente en las primeras etapas del desarrollo de los osteoclastos. La participación de factores polipeptídicos en las etapas terminales de la formación del osteoclasto no ha sido publicada extensivamente. Se ha publicado, sin embargo, que la hormona paratiroidea estimula la formación y la actividad de los osteoclastos y que la calcitonina tiene el efecto opuesto, aunque con un grado menor.

35 Recientemente, se ha descrito que un nuevo factor polipeptídico, llamado osteoprotegerina (OPG), regulaba negativamente la formación de osteoclastos *in vitro* e *in vivo* (véanse los documentos cedidos legalmente y en tramitación con la presente de EE.UU. con los N^{os}. 08/577.788 presentado el 22 de Diciembre de 1995, 08/706.945 presentado el 3 de Septiembre de 1996, y 08/771,777, presentado el 20 de Diciembre de 1996, incorporados en este documento como referencia; y la solicitud PCT N^o WO96/26271). El OPG aumentaba drásticamente la densidad ósea en ratones transgénicos que expresaban el polipéptido OPG y reducía el grado de pérdida ósea cuando se administraba a ratas ovariectomizada. Un análisis de la actividad de OPG en la formación de osteoclastos *in vitro* reveló que el OPG no interfiere en el crecimiento y la diferenciación de precursores de monocitos/macrófagos, aunque lo más probablemente bloquee la diferenciación de osteoclastos de precursores de monocitos/macrófagos. Así, el OPG parece tener especificidad en la regulación del grado de formación de osteoclastos.

45 El OPG comprende dos dominios polipeptídicos que tienen propiedades estructurales y funcionales diferentes. El dominio amino terminal que atraviesa aproximadamente los restos 22-194 del polipéptido de cadena entera (la metionina del extremo N-terminal es el resto denominado 1) muestra homología frente a otros miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), especialmente TNFR-2, por la conservación de dominios ricos en cisteína característicos de miembros de la familia TNFR. El dominio del extremo carboxi terminal que atraviesa los restos 194-401 no tiene ninguna homología significativa respecto a ninguna secuencia conocida. A diferencia de un número de otros miembros de la familia TNFR, el OPG parece ser exclusivamente una proteína secretada y no parece que sea sintetizada como una forma asociada a la membrana.

50 Basado en su actividad como un regulador negativo de la formación de osteoclastos, se postula que el OPG puede unirse a un factor polipeptídico implicado en la diferenciación de osteoclastos y que bloquea así una o varias etapas terminales que conducen a la formación de un osteoclasto maduro.

55 Por lo tanto, un objeto de la invención es identificar polipéptidos que interactúan con OPG. Dichos polipéptidos pueden desempeñar un papel en la maduración de los osteoclastos y pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades óseas.

Sumario de la invención

Un nuevo miembro de la familia del factor de necrosis tumoral ha sido identificado a partir de una genoteca de cADN murina expresado en células COS seleccionados usando una proteína de fusión OPG-Fc recombinante como una sonda de afinidad. El nuevo polipéptido es una proteína de unión a OPG transmembránica que se predice que tiene 316 aminoácidos de longitud, y que tiene un dominio citoplásmico amino terminal, un dominio transmembránico, y un dominio extracelular carboxi terminal. Las proteínas de unión de OPG de la invención pueden estar asociadas a la membrana o pueden estar en forma soluble.

La invención proporciona el uso de un anticuerpo como modulador de la proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp) para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar enfermedades óseas, en donde el anticuerpo es un antagonista que se une a OPGbp de las Figuras 4 A-F (SEQ ID NO:4) e inhibe osteoclastogénesis y/o resorción ósea mediadas por OPGbp. Se describen ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión a OPG, vectores y células huésped que expresan el polipéptido, y un método para producir la proteína de unión a OPG recombinante. También se describen anticuerpos o sus fragmentos que se unen específicamente a la proteína de unión a OPG.

Las proteínas de unión de OPG pueden ser usadas en ensayos para cuantificar los niveles de OPG en muestras biológicas, para identificar células y tejidos que muestran la proteína de unión a OPG, y para identificar el nuevo OPG y miembros de la familia de la proteína de unión a OPG. También se proporcionan métodos para identificar los compuestos que interactúan con la proteína de unión a OPG. Tales compuestos incluyen ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos o moléculas orgánicas de pequeño peso molecular y pueden actuar como agonistas o antagonistas de la actividad de la proteína de unión a OPG.

Las proteínas de unión de OPG están implicadas en la diferenciación de osteoclastos y el nivel de la actividad de osteoclastos a su vez modula la resorción del hueso. Los agonistas y antagonistas de la proteína de unión a OPG modulan la formación de osteoclastos y la resorción ósea y pueden usarse para tratar enfermedades óseas caracterizadas por cambios en la resorción ósea, tales como la osteoporosis, hipercalcemia, pérdida ósea debido a la metástasis de artritis, inmovilización o enfermedad periodontal, enfermedad de Paget, osteopetrosis, aflojamiento protésico y otros similares. Las composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de unión de OPG y agonistas de la proteína de unión a OPG y antagonistas también están comprendidas de acuerdo con la invención.

También se han identificado receptores para proteínas de unión de OPG a partir de una genoteca de cADN marino construida a partir de células de médula ósea que se unen a una proteína de unión a OPG con marcador fluorescente. Los receptores pueden ser usados para identificar agonistas y antagonistas de interacciones de la proteína de unión a OPG con su receptor que pueden usarse para tratar enfermedades óseas.

Descripción de las Figuras

Figuras 1A-F. Estructura y secuencia del inserto 32-F3 que codifica para la proteína de unión a OPG. El dominio de transmembrana predicho y los sitios para las cadenas de carbohidrato unidas por asparagina están subrayados.

Figuras 2A-C. Expresión de la proteína de unión a OPG en células COS-7 transfectadas con pcADN/32D-F3. Las células fueran lipofectadas con ADN de pcADN/32D-F3, las analizadas para unirse tanto a un conjugado de fosfatasa alcalina de IgG1 antihumano de cabra (secundario solo), OPG[22-201]-Fc humano más (OPG-Fc) secundario, como a una proteína de fusión Fc-dominio extracelular de ATAR quimérico (sATAR-Fc). El ATAR es un nuevo miembro de la superfamilia de TNFR, y la proteína de fusión sATAR-Fc sirve como un control tanto de la unión del dominio de IgG1 Fc humano, como de la proteína relacionada de TNFR genérica, que se une a moléculas de la superficie celular de 32D.

Figura 3. Expresión de la proteína de unión a OPG en tejidos humanos. Análisis Northern blot de mRNA de tejido humano (Clontech) utilizando una sonda de hibridación derivada de 32D-F3 radiomarcada. La masa molecular relativa se indica a la izquierda en pares de kilobases (kb). La flecha en el lado superior derecho indica la migración de una transcripción de aproximadamente 2,5 kb detectada en el mRNA del nodo de linfa. Una banda muy débil de la misma masa también se detecta en hígado fetal.

Figuras 4A-F. Estructura y secuencia del inserto pcADN/hu OPGbp 1.1 que codifica la proteína de unión a OPG humana. El dominio de transmembrana predicho y el sitio para cadenas de carbohidratos unidos por asparagina están subrayados.

Figura 5. Estimulación del desarrollo de osteoclastos *in vitro* a partir de cocultivos macrófagos de médula ósea y células ST2 tratados con proteína de unión a OPG recombinante murina [158-316]. Los cultivos fueron tratados con concentraciones variables de proteína de unión a OPG murina en el intervalo de 1,6 a 500 ng/ml. Después de 8-10 días, los cultivos fueron lisados, y la actividad de TRAP fue medida por ensayo de solución. Además, algunos cultivos fueron tratados simultáneamente con 1, 10, 100, 500, y 1000 ng/ml de la proteína OPG -Fc [22-401] recombinante murina. La proteína de unión a OPG murina induce una estimulación dependiente de la dosis en la formación de osteoclastos, mientras que OPG [22-401]-Fc inhibe la formación de osteoclastos.

Figura 6. Estimulación del desarrollo de osteoclastos a partir de precursores de la médula ósea *in vitro* en presencia de M-CSF y proteína de unión a OPG [158-316] murina. Se tomó médula ósea de ratón, y se cultivó en presencia de 250, 500, 1000 y 2000 U/ml de M-CSF. Concentraciones variables de proteína de unión a OPG [158-316], en el intervalo de 1,6 a 500 ng/ml, fueron añadidas a estos mismos cultivos. El desarrollo de osteoclastos fue medido por ensayo de solución de TRAP.

Figuras 7A-C. Osteoclastos derivados de células de médula ósea en presencia de proteína de unión [158-316] de tanto M-CSF como OPG reabsorben hueso *in vitro*. Las células de médula ósea tratadas con proteína de unión a M-CSF, OPG, o con ambos factores combinados, fueron puestas en placas en cortes óseos en pocillos de cultivo, y se dejaron desarrollar en osteoclastos maduros. Los cultivos resultantes entonces fueron teñidos con Azul de Toluidina (columna izquierda), o para detectar histoquímicamente la actividad enzimática de TRAP (columna derecha). En los cultivos que recibieron ambos factores, se formaron osteoclastos maduros que fueron capaces de erosionar el hueso como se observa por la presencia de hoyos teñidos de azul en la superficie del hueso. Esto se correlacionó con la presencia de células positivas TRAP grandes múltiples multinucleadas.

Figura 8. Gráfico que muestra los niveles de calcio ionizados (iCa) de sangre entera de ratones a los que se les inyectó proteína de unión a OPG, 51 horas después de la primera inyección, y en ratones que también recibieron la administración de OPG simultánea. La proteína de unión a OPG aumentó significativamente y dependientemente de la dosis los niveles de iCa. OPG (1 mg/kg/día) bloqueó completamente el aumento de iCa a una dosis de la proteína de unión a OPG de 5 µg/día, y bloqueó parcialmente el aumento a una dosis de la proteína de unión a OPG de 25 µg/día. (*), diferente al control tratado con vehículo (p < 0,05). (#), nivel de iCa tratado con OPG considerablemente diferente al nivel en ratones que recibieron aquella dosis de proteína de unión a OPG sola (p < 0,05).

Figuras 9A-D. Radiografías del fémur izquierdo y la tibia en ratones tratados con 0, 5, 25 ó 100 µg/día de proteína de unión a OPG durante 3,5 días. Hay una disminución dependiente de la dosis en la densidad ósea más claramente evidente en la metafisis tibial proximal de estos ratones, y que es profunda a una dosis de 100 µg/día.

Figuras 10A-F. Secuencia de cADN de ODAR murina y secuencia de la proteína. Se muestra la secuencia de ácido nucleico del clón de cADN de ~2,1 kb, y la traducción del marco de lectura abierto largo del resto 625 indicado anteriormente. El péptido señal hidrófobo está subrayado, y la secuencia transmembrana hidrófoba (restos 214-234) está en negrita. Los restos de cisteína que comprenden los motivos de repetición ricos en cisteína en el dominio extracelular están en negrita.

Figuras 11A-C. Tinción inmunofluorescente de la unión de ODAR-Fc a células transfectadas de la proteína de unión a OPG. Las células COS-7 transfectadas con el plásmido de expresión de la proteína de unión a OPG fueron incubadas con IgG Fc humano (panel superior), ODAR-Fc (panel medio) o OPG-Fc (panel inferior). Un anticuerpo IgG Fc antihumano de cabra FITC-marcado fue usado como anticuerpo secundario. Fueron examinadas células de unión positivas por microscopía confocal.

Figuras 12A-H. Efectos de ODAR-Fc en la generación de osteoclastos a partir de médula ósea de ratón *in vitro*. Cultivos de médula ósea murinos fueron realizados como en el Ejemplo 8 y fueron expuestos a la proteína de unión a OPG (5 ng/ml) y CSF-1 (30 ng/ml). Fueron añadidas varias concentraciones de ODAR-Fc en el intervalo de 1500 ng/ml a 65 ng/ml. La formación de osteoclastos fue evaluada por citoquímica de TRAP y el ensayo de solución de TRAP después de 5 días en cultivo.

Figura 13. Densidad de mineral de hueso en ratones después de tratamiento durante cuatro días con ODAR-Fc a dosis variables. Los ratones recibieron ODAR-Fc por inyección subcutánea diaria en un vehículo de solución salina tamponado con fosfato. La densidad mineral fue determinada a partir de huesos fijados en ETOH del 70% en ratones con metafisis tibial proximal por tomografía computerizada cuantitativa periférica (pQCT) (XCT-960M, Nordland Medical Systems, Ft Atkinson, WI). Fueron analizados dos cortes transversales de 0,5 mm de hueso, 1,5 mm y 2,0 mm del extremo proximal de la tibia (XMICE 5.2, Stratec, Alemania) para determinar la densidad de mineral de hueso total en la metafisis. Un umbral de separación de tejido blando de 1500 fue usado para definir el límite del hueso metafisaria. ODAR-Fc produjo un aumento significativo de la densidad de mineral óseo en la metafisis tibial proximal de una manera dependiente de la dosis. Grupo n = 4.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un polipéptido denominado proteína de unión a OPG, que se une específicamente a OPG y que está implicado en la diferenciación de osteoclastos. Un clón de cADN que codifica la forma murina del polipéptido fue identificado a partir de una genoteca preparada a partir de una línea celular 32-D mielomonocítica de ratón y fue transfectado en células COS. Los transfectantes fueron seleccionados por su capacidad de unirse a un polipéptido de fusión OPG [22-201]-Fc (Ejemplo 1). La secuencia de ácidos nucleicos reveló que la proteína de unión a OPG es un nuevo miembro de la familia de TNF y que está más estrechamente asociada con AGP-1, un polipéptido antes descrito en el documento de EE.UU. cedido legalmente y en tramitación con la presente con el N° 08/660.562, presentado el 7 de Junio de 1996. (Un polipéptido idéntico a AGP-1 denominado TRAIL se describe en Wiley *et al. Immunity* **3**, 673-682 (1995)). La proteína de unión a OPG se predice que es una proteína transmembrana tipo II de que tiene un dominio citoplasmático en el extremo amino, un dominio transmembrana, y un dominio extracelular

carboxi terminal (Figuras 1A-F). El dominio citoplásmico amino terminal atraviesa aproximadamente los restos 1-48, el dominio transmembrana atraviesa aproximadamente los restos 49-69 y el dominio extracelular atraviesa aproximadamente los restos 70-316 como se muestra en las Figuras 1A-F (SEQ ID NO: 2). La proteína asociada a la membrana se une específicamente a OPG (Figuras 2A-C). Así la proteína de unión a OPG y OPG comparten muchas características de un par receptor-ligando aunque es posible que existan otros receptores naturales para la proteína de unión a OPG.

Un clon de ADN que codifica la proteína de unión a OPG humana fue aislado a partir de una genoteca de cADN de nodo de linfa. La secuencia humana (Figuras 4A-F) es homóloga a la secuencia murina. La proteína de unión a OPG murina purificada soluble estimuló la formación de osteoclastos *in vitro* e indujo hipercalcemia y resorción ósea *in vivo*.

La proteína de unión a OPG se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una proteína de unión a OPG de mamífero, o su fragmento, análogo, o derivado, y que tiene al menos la actividad de unirse a OPG. En realizaciones preferidas, la proteína de unión a OPG es de origen murino o humano. En otra realización, la proteína de unión a OPG es una proteína soluble que tiene, en una forma, un dominio extracelular aislado separado de los dominios citoplásmicos y transmembránicos. La proteína de unión a OPG está implicada en la diferenciación de osteoclastos y en el grado y la extensión de la resorción ósea, y fue encontrado que estimulaba la formación de osteoclastos y que estimulaba la resorción ósea.

Ácidos nucleicos

La invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican proteínas de unión de OPG. Como se usa en este documento, la expresión ácido nucleico comprende cADN, ADN genómico, ADN totalmente o parcialmente sintético y ARN. Los ácidos nucleicos de la invención son seleccionados a partir del grupo que consiste en:

a) los ácidos nucleicos que se muestran en las Figuras 1A-F (SEQ ID NO: 1) y Figuras 4A-F (SEQ ID NO: 3);

b) los ácidos nucleicos que se hibridan con las regiones que codifican el polipéptido de los ácidos nucleicos mostrados en las Figuras 1A-F (SEQ ID NO: 1) y las Figuras 4A-F (SEQ ID NO: 3); y que permanecen hibridados a los ácidos nucleicos en fuertes condiciones rigurosas; y

c) los ácidos nucleicos que son degenerados respecto a los ácidos nucleicos de (a) o (b).

Las hibridaciones de ácidos nucleicos típicamente implican un procedimiento de varias etapas que comprende una primera etapa de hibridación para formar doble hélices de ácidos nucleicos a partir de cadenas sencillas seguido de una segunda etapa de hibridación llevada a cabo en condiciones más rigurosas para conservar selectivamente las doble hélices de ácidos nucleicos que tienen la homología deseada. Las condiciones de la primera etapa de hibridación no son generalmente cruciales, a condición de que no sean más rigurosas que las de la segunda etapa de hibridación. Generalmente, la segunda hibridación se lleva a cabo en condiciones de alta rigurosidad, en la que las condiciones de "alta rigurosidad" se refieren a condiciones de temperatura y sal que son de aproximadamente 12-20°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de un híbrido perfecto de parte o todas las cadenas complementarias correspondientes a las Figuras 1A-F (SEQ. ID. NO: 2) y Figuras 4A-F (SEQ ID NO: 4). En una realización, las condiciones de "alta rigurosidad" se refieren a condiciones de aproximadamente 65°C y no más de aproximadamente Na^+ 1 M. Se entiende que la concentración de sales, la temperatura y/o el tiempo de incubación pueden ser variados en la primera o en la segunda etapa de hibridación tal que se obtengan las moléculas de ácidos nucleicos hibridantes de acuerdo con la invención. Las condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos y los cálculos de T_m para los híbridos de ácidos nucleicos están descritos en Sambrook *et al.* "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press", Nueva York (1989).

Los ácidos nucleicos de la invención pueden hibridarse a parte o a todas las regiones que codifican el polipéptido de la proteína de unión a OPG como se muestra en las Figuras 1A-F (SEQ ID NO: 2) y las Figuras 4A-F (SEQ ID NO: 4); y por lo tanto pueden ser truncamientos o extensiones de las secuencias de ácido nucleico mostradas allí. Ácidos nucleicos truncados o ampliados están comprendidos en la invención a condición de que conserven al menos la propiedad de unirse a OPG. En una realización, el ácido nucleico codificará un polipéptido de al menos aproximadamente 10 aminoácidos. En otra realización, el ácido nucleico codificará un polipéptido de al menos aproximadamente 20 aminoácidos. En otra realización más, el ácido nucleico codificará un polipéptido de al menos aproximadamente 50 aminoácidos. Los ácidos nucleicos hibridantes también pueden incluir secuencias no codificantes localizadas 5' y/o 3' respecto a regiones codificantes de la proteína de unión a OPG. Las secuencias no codificantes incluyen regiones reguladoras implicadas en la expresión de la proteína de unión a OPG, tales como promotores, regiones de potenciador, sitios de iniciación de translación, sitios de terminación de transcripción y otros similares.

En realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos de la invención codifican la proteína de unión a OPG de ratón o humana. Los ácidos nucleicos pueden codificar una forma unida a la membrana de la proteína de unión a OPG o formas solubles que carezcan de una región transmembrana funcional. La región transmembrana predicha para la proteína de unión a OPG murina incluye los restos de aminoácidos 49-69 inclusive como se muestra en las Figuras 1A-F (SEQ. ID. NO: 1). La región transmembrana predicha para la proteína de unión a OPG humana incluye los restos 49-69 como se muestra en las Figuras 4A-F (SEQ ID NO: 3). Sería esperable que las sustituciones que susti-

tuyen restos de aminoácidos hidrófobos en esta región con restos de aminoácido neutros o hidrófilos interrumpen la asociación de la membrana y que causen la proteína de unión a OPG soluble. Además, también sería esperable que las delecciones de parte o toda la región transmembrana produzcan formas solubles de la proteína de unión a OPG. Los ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácido 70-316 como se muestra en las Figuras 1A-F (SEQ ID NO: 1), o sus fragmentos y análogos, comprenden proteínas de unión de OPG solubles.

También se incluyen los ácidos nucleicos que codifican las formas truncadas de proteínas de unión de OPG humanas solubles. Las formas solubles incluyen los restos 69-317 como se muestra en las Figuras 4A-F (SEQ ID NO: 3) y sus truncamientos. En una realización, los truncamientos del extremo N-terminal generan polipéptidos a partir de los restos, 70-317, 71-317, 72-317, etcétera. En otra realización, los ácidos nucleicos codifican OPGbp soluble que comprenden los restos 69-317 y sus truncamientos del extremo N-terminal hasta OPGbp [158-317], o de forma alternativa, hasta OPGbp [166-317].

El plásmido phuOPGbp 1,1 en la cepa DH10 de *E. coli* que codifica la proteína de unión a OPG humana fue depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD el 13 de Junio de 1997.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden ser usadas para la detección de secuencias que codifican la proteína de unión a OPG en muestras biológicas. En particular, las secuencias pueden ser usadas para rastrear genotecas de cADN y genómicas para secuencias de la proteína de unión a OPG relacionadas, especialmente las de otra especie. Los ácidos nucleicos son también útiles para modular niveles de la proteína de unión a OPG por la tecnología antisentido o de expresión génica *in vivo*. El desarrollo de animales transgénicos que expresan la proteína de unión a OPG es útil para la producción del polipéptido y para el estudio de la actividad biológica *in vivo*.

20 Vectores y células huésped

Los ácidos nucleicos de la invención serán unidos con secuencias de ADN para expresar la proteína de unión a OPG biológicamente activa. Se conocen secuencias requeridas para la expresión para los expertos en la técnica e incluyen a secuencias de promotores y potenciador para la iniciación de la síntesis de ARN, sitios de terminación de la transcripción, sitios de unión del ribosoma para la iniciación de la síntesis de proteínas, y secuencias líder para la secreción. Las secuencias que dirigen la expresión y la secreción de la proteína de unión a OPG pueden ser homólogas, es decir, las secuencias son idénticas o similares a las secuencias en el genoma implicado en la expresión y la secreción de la proteína de unión a OPG, o pueden ser heterólogas. Una variedad de vectores de plásmido está disponible para expresar la proteína de unión a OPG en células huésped (véase, por ejemplo, "Methods in Enzymology V". 185, Goeddel, D.V. editor, Academic Press (1990)). Para la expresión en células huésped de mamífero, una realización preferida es el plásmido pDSR α descrito en la Solicitud PCT N° 90/14363. Para la expresión en células huésped bacterianas, las realizaciones preferidas incluyen los plásmidos que comprenden al promotor lux (véase el documento cedido legalmente y en tramitación con la presente de EE.UU. con el N° 08/577.778, presentado el 22 de Diciembre de 1995). Además, los vectores están disponibles para la expresión específica en tejido de la proteína de unión a OPG en animales transgénicos. Los vectores retrovirales y de transferencia génica basados en adenovirus también pueden ser usados para la expresión de la proteína de unión a OPG en células humanas para terapia *in vivo* (véase la Solicitud PCT N° 86/00922).

Células huésped procariotas y eucariotas que expresan la proteína de unión a OPG también son proporcionadas por la invención. Las células huésped incluyen células bacterianas, de levadura, planta, insecto o mamífero. La proteína de unión a OPG también puede ser producida en animales transgénicos tales como ratones o cabras. Los plásmidos y vectores que contienen los ácidos nucleicos de la invención son introducidos en las células huésped apropiadas usando técnicas de transfección o transformación conocidas por los expertos en la técnica. Las células huésped pueden contener secuencias de ADN que codifican la proteína de unión a OPG como se muestra en las Figuras 1A-F o una parte suya, tal como el dominio extracelular o el dominio citoplásmico. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión de OPG pueden ser modificados por la sustitución de codones que permitan una expresión óptima en un huésped dado. Al menos algunos de los codones pueden ser los codones denominados de preferencia que no cambian la secuencia de aminoácidos y que con frecuencia se encuentran en genes que son altamente expresados. Sin embargo, se entiende que las alteraciones del codon para optimizar la expresión no están restringidas a la introducción de codones de preferencia. Los ejemplos de células huésped de mamífero preferidas para la expresión de la proteína de unión a OPG incluyen, pero no están limitados, a células COS, CHO α -, 293 y 3T3. Una célula huésped preferida bacteriana es *Escherichia coli*.

Polipéptidos

La invención también proporciona la proteína de unión a OPG como producto de expresión procariota o eucariota de una secuencia de ADN exógena, es decir, la proteína de unión a OPG es una proteína de unión a OPG recombinante. Las secuencias de ADN exógenas incluyen secuencias de cADN, ADN genómico y ADN sintético. La proteína de unión a OPG puede ser un producto de expresión de células bacterianas, de levadura, planta, insecto o mamífero, o de sistemas de traducción de célula libre. La proteína de unión a OPG producida en células bacterianas tendrá un resto de metionina del extremo N-terminal. La invención también proporciona un procedimiento para producir la proteína de unión a OPG que comprende cultivar células huésped procariotas o eucariotas transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a OPG y aislar los productos de expresión polipeptídicos.

cos de los ácidos nucleicos.

Los polipéptidos que son proteínas de unión de OPG de mamíferos o son sus fragmentos, análogos o derivados están comprendidos según la invención. En una realización preferida, la proteína de unión a OPG es la proteína de unión a OPG humana. Un fragmento de la proteína de unión a OPG se refiere a un polipéptido que tiene una delección de uno o varios aminoácidos tal que el polipéptido resultante tiene al menos la propiedad de unirse a OPG. Dichos fragmentos tendrán delecciones que provienen del extremo amino terminal, el extremo carboxi terminal, y las regiones internas del polipéptido. Los fragmentos de la proteína de unión a OPG son de al menos aproximadamente diez aminoácidos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos, o al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En realizaciones preferidas, la proteína de unión a OPG tendrá una delección de uno o varios aminoácidos de la región transmembrana (restos de aminoácidos 49-69 como se muestra en las Figuras 1A-F), o, de forma alternativa, uno o varios aminoácidos del extremo amino hasta y/o incluyendo la región transmembrana (restos de aminoácidos 1-49 como se muestra en las Figuras 1A-F). En otra realización, la proteína de unión a OPG es una proteína soluble que comprende, por ejemplo, los restos de aminoácidos 69-316, o 70-316, o sus formas truncadas del extremo N-terminal o C-terminal, que conserva la actividad de unión de OPG. La proteína de unión a OPG también es una proteína soluble humana como se muestra en las Figuras 4A-F que comprende los restos 69-317 como se muestra en las Figuras 4A-F y sus formas truncadas del extremo N-terminal, por ejemplo, 70-517, 71-517, 71-317, 72-317 etcétera. En una realización preferida, la proteína de unión a OPG soluble humana comprende los restos 69-317 y sus truncamiento del extremo N-terminal hasta OPGbp [158-317], o de forma alternativa hasta OPG [166-317].

Un análogo de una proteína de unión a OPG se refiere a un polipéptido que tiene una sustitución o adición de uno o varios aminoácidos tal que el polipéptido resultante tiene al menos la propiedad de unirse a OPG. Dichos análogos tendrán sustituciones o adiciones en cualquier sitio a lo largo del polipéptido. Los análogos preferidos incluyen los de las proteínas de unión de OPG solubles. Los fragmentos o análogos pueden ser naturales, tales como un producto de polipéptido de una variante alélica o una variante de empalme de mRNA, o pueden ser construidos usando técnicas disponibles para un experto en la técnica para manipular y sintetizar ácidos nucleicos. Los polipéptidos pueden o no tener un resto de metionina del amino terminal.

También están incluidos en la invención los derivados de la proteína de unión a OPG que sean polipéptidos que hayan sufrido modificaciones de post-translación (por ejemplo, la adición de cadenas de carbohidrato N-unidas u O-unidas, procesamiento de los extremos N-terminal o C-terminal), la adición de restos químicos a la estructura del aminoácido, las modificaciones químicas de cadenas de carbohidrato N-unidas u O-unidas, y la adición de un resto de metionina del extremo N-terminal como consecuencia de la expresión de células huésped procariotas. En particular, son contemplados los derivados químicamente modificados de la proteína de unión a OPG que proporcionan ventajas adicionales tales como una mayor estabilidad, tiempo circulante más largo, o menor inmunogenicidad. De uso particular es la modificación con polímeros solubles en agua, tales como el polietilenglicol y sus derivados (véase por ejemplo la Patente de EE.UU. N° 4.179.337). Los restos químicos para la derivatización pueden ser seleccionados a partir de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol de vinilo) y otros similares. Los polipéptidos pueden ser modificados en posiciones aleatorias dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos. Los polipéptidos también pueden ser modificados en posiciones predeterminadas en el polipéptido, tal como en el extremo amino, o en un resto lisina o arginina seleccionado dentro del polipéptido. Otras modificaciones química proporcionadas incluyen un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento de la proteína.

Las quimeras de la proteína de unión a OPG que comprenden parte o toda la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a OPG fusionada a una secuencia de aminoácidos heteróloga también están incluidas. La secuencia heteróloga puede ser cualquier secuencia que permita a la proteína de fusión resultante conservar al menos la actividad de unión a OPG. En una realización preferida, el dominio extracelular del extremo carboxi terminal de la proteína de unión a OPG se fusiona a una secuencia heteróloga. Tales secuencias incluyen dominios citoplásmicos heterólogos que proporcionan acontecimientos de señalización intracelular alternativos, secuencias que promueven la oligomerización tal como la región Fc de IgG, las secuencias enzimáticas que proporcionan un marcador para el polipéptido, y las secuencias que proporcionan sondas de afinidad, tales como un reconocimiento antígeno-anticuerpo.

Los polipéptidos de la invención son aislados y purificados a partir de tejidos y líneas celulares que expresan la proteína de unión a OPG, extraídos a partir de lisados o a partir de medio de crecimiento acondicionado, y a partir de células huésped transformadas que expresan la proteína de unión a OPG. La proteína de unión a OPG puede ser obtenida a partir de la línea celular mielomonocítica 32-D murina (N° del catálogo ATCC CRL-11346). La proteína de unión a OPG humana, o los ácidos nucleicos que codifican la misma, pueden ser aislados a partir del nodo de linfa humano o de tejido de hígado fetal. La proteína de unión a OPG aislada está libre de asociación con proteínas humanas y otros constituyentes de la célula.

Un método para la purificación de la proteína de unión a OPG a partir de fuentes naturales (por ejemplo, tejidos y líneas celulares que normalmente expresan la proteína de unión a OPG) y a partir de células huésped transfectadas también está comprendido según la invención. El procedimiento de purificación puede emplear una o varias etapas

de purificación de proteínas estándar en un orden apropiado para obtener la proteína purificada. Las etapas de cromatografía pueden incluir intercambio iónico, filtración de gel, interacción hidrófoba, fase inversa, cromatoenfoque, cromatografía de afinidad que emplea un anticuerpo de la proteína de unión anti-OPG o el complejo de afinidad biotina-estreptavidina y otros similares.

5 Anticuerpos

Los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención también están comprendidos según la invención. Los anticuerpos pueden ser producidos por la inmunización con la proteína de unión a OPG de cadena entera, las formas solubles de la proteína de unión a OPG, o sus fragmentos. Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales, o pueden ser recombinantes, tales como los anticuerpos quiméricos en los que las regiones constantes murinas en las cadenas ligeras y pesadas son sustituidas por secuencias humanas, o anticuerpos injertados en las CDR en los que sólo las regiones determinantes complementarias son de origen murino. Los anticuerpos de la invención también pueden ser anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, por la inmunización de animales transgénicos capaces de producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la Solicitud PCT N° WO93/12227). Los anticuerpos son útiles para detectar la proteína de unión a OPG en muestras biológicas, permitiendo así la identificación de células o tejidos que producen la proteína. Además, los anticuerpos que se unen a la proteína de unión a OPG y la interacción de bloque con otros compuestos de unión pueden tener uso terapéutico en modular la diferenciación de osteoclastos y la resorción ósea.

Los anticuerpos contra la proteína de unión a OPG pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades óseas, tales como, osteoporosis y enfermedad de Paget. Los anticuerpos pueden ser analizados al unirse a la proteína de unión a OPG en ausencia o presencia de OPG y ser examinados por su capacidad de inhibir la resorción ósea y/o la osteoclastogénesis mediada por ligando (proteína de unión a OPG). También se espera que los mismos péptidos puedan actuar como un antagonista de la interacción ligando:receptor e inhibir la osteoclastogénesis mediada por ligando, y los péptidos de la proteína de unión a OPG serán explorados para este propósito también.

Composiciones

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a OPG de la invención junto con un diluyente farmacéuticamente aceptable, vehículo, solubilizador, emulsionante, conservante y/o adyuvante. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista o antagonista de la proteína de unión a OPG. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una condición específica y una ruta de administración. La composición puede estar en una forma líquida o liofilizada y comprende un diluyente (tampones de Tris, acetato o fosfato) que tiene varios valores de pH y fuerzas iónicas, solubilizadores tales como Tween o Polisorbato, vehículos tales como albúmina de suero humana o gelatina, conservantes tales como timerosal o alcohol bencílico, y antioxidantes tales como ácido ascórbico o metabisulfito de sodio. La selección de una composición particular dependerá de un número de factores, incluyendo la condición que se trate, la ruta de administración y los parámetros farmacocinéticos deseados. Una revisión más extensa del componente adecuado para composiciones farmacéuticas se encuentra en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 ed. A.R. Gennaro, editor. Mack, Easton, PA (1980).

En una realización preferida, también se proporcionan composiciones que comprenden proteínas de unión de OPG solubles. También están comprendidas composiciones que comprenden la proteína de unión a OPG soluble modificada con polímeros solubles en agua para aumentar la solubilidad, estabilidad, semivida en plasma y biodisponibilidad. Las composiciones también pueden comprender la incorporación de la proteína de unión a OPG soluble en liposomas, microemulsiones, micelas o vesículas para la administración controlada durante un período ampliado de tiempo. La proteína de unión a OPG soluble puede ser formulada en micropartículas adecuadas para la administración pulmonar.

Las composiciones de la invención pueden ser administradas por inyección, subcutánea, intravenosa o intramuscular, o administración oral, nasal, pulmonar o rectal. La ruta de administración eventualmente escogida dependerá de un número de factores y puede ser averiguada por un experto en la técnica.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de los ácidos nucleicos de la invención junto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de ácidos nucleicos serán adecuadas para la administración de parte o toda la región de codificación de la proteína de unión a OPG y/o regiones flanqueantes de células y tejidos como parte de un régimen de terapia antisentido.

Métodos de uso

Las proteínas de unión de OPG pueden ser usadas en una variedad de ensayos para detectar OPG y caracterizar las interacciones con OPG. En general, el ensayo comprende incubar la proteína de unión a OPG con una muestra biológica que contenga OPG en condiciones que permitan la unión de OPG a la proteína de unión a OPG, y medir el grado de unión. Puede ser purificado OPG o puede estar presente en mezclas, tales como en fluidos corporales o medios de cultivo. Los ensayos que pueden ser desarrollados son cualitativos o cuantitativos, siendo éste útil para

determinar los parámetros de unión (constantes de afinidad y cinéticas) de OPG a la proteína de unión a OPG y para cuantificar los niveles de OPG biológicamente activos en mezclas. Los ensayos también pueden ser usados para evaluar la unión de OPG a fragmentos, análogos y derivados de la proteína de unión a OPG e identificar el nuevo OPG y los miembros de la familia de la proteína de unión a OPG.

5 La unión de OPG a la proteína de unión a OPG puede ser llevada a cabo en varios formatos, incluyendo ensayos de unión basados en células, ensayos de unión de membrana, ensayos en fase de disolución e inmunoensayos. En general, los niveles traza de OPG marcados son incubados con muestras de la proteína de unión a OPG durante un período de tiempo especificado seguido de la medida de OPG unido por filtración, electroquimioluminiscente inmunoensayos o ensayos basados en células (ECL, ORIGEN system por IGEN). También pueden ser puestas en práctica tecnologías de ensayo homogéneas con radiactividad (SPA; Amersham) y fluorescencia con resolución temporal (HTRF, Packard). La unión es detectada marcando OPG o un anticuerpo anti-OPG con isótopos radiactivos (^{125}I , ^{35}S , ^3H), tintes fluorescentes (fluoresceína), quelatos o criptatos de lantánido (Eu^{3+}), o complejos de bipyridil-rutenio (Ru^{2+}). Se entiende que la opción de una sonda marcada dependerá del sistema de detección usado. De forma alternativa, el OPG puede ser modificado con un marcador de epítipo no marcado (por ejemplo, biotina, péptidos, His₆, myc) y unirse a proteínas tales como la estreptavidina, anticuerpos antipéptido o antiproteína que tienen un marcador detectable como se describe anteriormente.

En un método alternativo, la proteína de unión a OPG puede ser analizada directamente usando anticuerpos policlonales o monoclonales respecto a las proteínas de unión de OPG en un inmunoensayo. Las formas adicionales de proteínas de unión de OPG que contienen marcadores de epítipo como se describe anteriormente pueden ser usadas en solución y en inmunoensayos.

Los métodos para identificar los compuestos que interactúan con la proteína de unión a OPG también están comprendidos según la invención. El método comprende incubar la proteína de unión a OPG con un compuesto en condiciones que permitan la unión del compuesto a la proteína de unión a OPG, y medir el grado de unión. El compuesto puede ser purificado sustancialmente o estar presente en una mezcla a granel. Los compuestos de unión pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos o compuestos orgánicos de pequeño peso molecular. Los compuestos además pueden ser caracterizados por su capacidad de aumentar o disminuir la actividad de la proteína de unión a OPG para determinar si actúan como un agonista o un antagonista.

Las proteínas de unión de OPG son también útiles para identificar las proteínas intracelulares que interactúan con el dominio citoplásmico mediante un procedimiento de rastreo de dos híbridos de levadura. Como ejemplo, pueden usarse construcciones de híbrido que comprendan ADN que codifica los 50 aminoácidos del extremo N-terminal de una proteína de unión a OPG fusionada a un dominio de unión GAL4-ADN de levadura como un plásmido de cebo de dos híbridos. Los clones positivos que surgen del rastreo pueden ser caracterizados además para identificar a las proteínas que interactúan. Esta información puede ayudar a aclarar el mecanismo de señalización intracelular asociado con la proteína de unión a OPG y proporcionar objetivos intracelulares para nuevos fármacos que modulen la resorción ósea.

La proteína de unión a OPG puede ser usada para tratar condiciones caracterizadas por una excesiva densidad ósea. La condición más común es la osteopetrosis en la que un defecto genético causa una masa ósea elevada y es por lo general fatal en los pocos primeros años de vida. La osteopetrosis es tratada preferiblemente por la administración de la proteína de unión a OPG soluble.

La invención también comprende moduladores (agonistas y antagonistas) de la proteína de unión a OPG y los métodos para obtenerlos. Un modulador de la proteína de unión a OPG puede o aumentar o disminuir al menos una actividad asociada con la proteína de unión a OPG, tal como la capacidad de unirse a OPG o a alguna otra molécula que interactúe o puede regular la maduración de osteoclastos. Típicamente, un agonista o antagonista puede ser un cofactor, tal como una proteína, péptido, carbohidrato, lípido o molécula de pequeño peso molecular, que interactúe con la proteína de unión a OPG para regular su actividad. Los potenciales antagonistas de polipéptido incluyen los anticuerpos que reaccionan con formas solubles o asociadas a membrana de la proteína de unión a OPG, y las formas solubles de la proteína de unión a OPG que comprenden parte o todo el dominio extracelular de la proteína de unión a OPG. Las moléculas que regulan la expresión de la proteína de unión a OPG incluyen típicamente los ácidos nucleicos que son complementarios a los ácidos nucleicos que codifican la proteína de unión a OPG y que actúan como reguladores antisentido de la expresión.

La proteína de unión a OPG está implicada en el control de la formación de osteoclastos maduros, el tipo de célula primaria implicada en la resorción ósea. Un aumento de la velocidad de resorción ósea (sobre la de formación de hueso) puede conducir a varios trastornos óseos denominados en conjunto osteopenias, e incluir la osteoporosis, osteomielitis, hipercalcemia, osteopenia producida por cirugía o administración de esteroides, enfermedad de Paget, osteonecrosis, pérdida ósea debida a artritis reumatoide, pérdida ósea periodontal, inmovilización, aflojamiento protésico y metástasis osteolítica. A la inversa, una disminución en la velocidad de resorción ósea puede conducir a osteopetrosis, una condición marcada por una excesiva densidad ósea. Los agonistas y los antagonistas de la proteína de unión a OPG modulan la formación de osteoclastos y pueden ser administrados a pacientes que sufran de trastornos óseos. Los agonistas y los antagonistas de la proteína de unión a OPG usada para el tratamiento de osteopenias pueden ser administrados solos o en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente

que promueva el crecimiento óseo incluyendo factores morfogénicos óseos denominados de BMP-1 a BMP-12, factor β de crecimiento transformante y miembros de la familia TGF- β , factores de crecimiento de fibroblasto de FGF-1 a FGF-10, inhibidores de interleuquina-1, inhibidores de TNF α , hormona paratiroidea, prostaglandinas de la serie E, bisfosfonatos y minerales potenciadores óseos tales como fluoruro y calcio. Los antagonistas de las proteínas de unión de OPG pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de la osteopenia.

Receptores para proteínas de unión de osteoprotegerina

La invención también proporciona receptores que interactúan con las proteínas de unión de OPG. Más particularmente, la invención proporciona una diferenciación de osteoclastos y el receptor de activación (ODAR). El ODAR es un polipéptido transmembrana que muestra el grado más alto de homología respecto a CD40, un miembro de la familia del receptor de TNF. Se muestra la secuencia de ácidos nucleicos de ODAR murino y el polipéptido codificado en las Figuras 10A-F. El homólogo humano de ODAR murino puede ser aislado fácilmente por rastreo por hibridación de una genoteca de cADN humano o genómica con la secuencia de ácidos nucleicos de las Figuras 10A-F. Los procedimientos para clonar el ODAR humano son similares a los descritos en el Ejemplo 5 para clonar proteínas de unión de OPG humanas. El homólogo humano del polipéptido mostrado en las Figuras 10A-F ha aparecido en Anderson *et al.* (*Nature* **390**, 175-179 (1997)) y se denomina en este documento RANK. El RANK se caracteriza como una proteína transmembrana tipo I que tiene homología respecto a miembros de la familia del receptor de TNF y que está implicado en la función de células dendríticas.

Se muestran pruebas de la interacción de ODAR y la proteína de unión a OPG en el Ejemplo 13. Una forma soluble de ODAR (la proteína de fusión ODAR-Fc) previene la maduración de osteoclastos *in vitro* (Figuras 12A-H) y aumenta la densidad ósea en ratones normales después de la inyección subcutánea (Figura 13). Los resultados son compatibles con la proteína de unión a OPG que interactúa y que activa ODAR para promover la maduración de osteoclastos.

El desarrollo de osteoclastos y la tasa y el grado de resorción ósea son regulados por la interacción de la proteína de unión a OPG y ODAR. Los compuestos que disminuyen o bloquean la interacción de la proteína de unión a OPG y ODAR son potenciales antagonistas de la actividad de la proteína de unión a OPG y pueden interrumpir el desarrollo de osteoclastos lo que conduce a una menor resorción ósea. De forma alternativa, los compuestos que aumentan la interacción de la proteína de unión a OPG y ODAR son agonistas potenciales que promueven el desarrollo de osteoclastos y realzan la resorción ósea.

Una variedad de ensayos puede ser usada para medir la interacción de la proteína de unión a OPG y ODAR *in vitro* usando proteínas purificadas. Estos ensayos pueden ser usados para seleccionar compuestos por su capacidad de aumentar o disminuir la tasa o el grado de unión a ODAR por la proteína de unión a OPG. En un tipo de ensayo, la proteína de ODAR puede ser inmovilizada por la adhesión al fondo de los pocillos de una placa de microtítulo. La proteína de unión a OPG radiomarcada (por ejemplo, la proteína de unión a OPG yodada) y el(los) compuesto(s) de ensayo puede(n) ser añadido(s) después tanto uno por uno (en un orden u otro) o simultáneamente a los pocillos. Después de la incubación, los pocillos pueden ser lavados y sometidos a recuento usando un contador de centelleo en función de la radiactividad para determinar el grado de unión de ODAR por la proteína de unión a OPG en presencia del compuesto de ensayo. Típicamente el compuesto será analizado en un intervalo de concentraciones, y puede ser usada una serie de pocillos de control que carezcan de uno o varios elementos de los ensayos de prueba por su exactitud en la evaluación de los resultados. Una alternativa a este método implica invertir las "posiciones" de las proteínas, es decir, la acción de inmovilizar la proteína de unión a OPG a los pocillos de la placa de microtítulo, incubar con el compuesto de ensayo y ODAR radiomarcado, y determinar el grado de unión de ODAR (véase, por ejemplo, el capítulo 18 de "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Nueva York [1995]).

Como una alternativa al radiomarcaje, la proteína de unión a OPG u ODAR puede ser conjugada a biotina y entonces la presencia de la proteína biotinilada puede ser detectada usando estreptavidina unida a una enzima, tal como la peroxidasa de rábano picante [HRP] o la fosfatasa alcalina [AP], que pueden ser detectadas colorimétricamente, o por marcación fluorescente con estreptavidina. También puede ser usado un anticuerpo dirigido a la proteína de unión a OPG u ODAR que esté conjugado a biotina y puede ser detectado después de la incubación con estreptavidina unida con la enzima unida a AP o HRP.

La proteína de unión a OPG y ODAR también pueden ser inmovilizados por la adhesión a perlas de agarosa, perlas acrílicas u otros tipos de tales sustratos inertes. El complejo de sustrato-proteína puede ser colocado en una solución que contenga la proteína complementaria y el compuesto de ensayo; después de la incubación, las perlas pueden ser precipitadas por centrifugación, y la cantidad de unión entre la proteína de unión a OPG y ODAR puede ser evaluada usando los métodos descritos anteriormente. De forma alternativa, el complejo sustrato-proteína puede ser inmovilizado en una columna y puede pasarse en la columna la molécula de ensayo y la proteína complementaria. La formación de un complejo entre la proteína de unión a OPG y ODAR puede ser evaluada entonces usando cualquiera de las técnicas expuestas anteriormente, es decir, radiomarcaje, unión de anticuerpo, o similares.

Otro tipo de ensayo *in vitro* que es útil para identificar un compuesto que aumente o disminuya la formación de un complejo de ODAR/proteína de unión a OPG es un sistema detector de resonancia superficial de plasmón tal como

el sistema de ensayo de Biacore (Pharmacia, Piscataway, NJ). El sistema Biacore puede llevarse a cabo usando el protocolo del fabricante. Este ensayo implica esencialmente la unión covalente de la proteína de unión a OPG o de ODAR a un chip sensor revestido con dextrano que está localizado en un detector. El compuesto de ensayo y la otra proteína complementaria entonces pueden ser inyectados en la cámara que contiene el chip sensor simultáneamente o secuencialmente y la cantidad de proteína complementaria que se une puede ser evaluada basado en el cambio de la masa molecular que está físicamente asociada con el lado revestido por el dextrano del chip sensor; el cambio de la masa molecular puede ser medido por el sistema detector.

En algunos casos, puede ser deseable evaluar dos o más compuestos de ensayo juntos para usar en aumentar o disminuir la formación del complejo de proteína de unión ODAR/OPG. En estos casos, los ensayos expuestos anteriormente pueden ser modificados fácilmente añadiendo tal(es) compuesto(s) de ensayo adicional(es) simultáneamente, o posteriormente al primer compuesto de ensayo. El resto de las etapas en el ensayo son como se exponen anteriormente.

Ensayos *in vitro* como los descritos anteriormente pueden ser usados ventajosamente para rastrear rápidamente grandes números de compuestos para efectos en la formación del complejo por la proteína de unión a OPG y ODAR. Los ensayos pueden ser automatizados para seleccionar los compuestos generados en la demostración de bacteriófagos, péptido sintético y genotecas de síntesis químicas.

Los compuestos que aumentan o disminuyen la formación del complejo de la proteína de unión a OPG y ODAR también pueden ser seleccionados en un cultivo celular usando células que llevan ODAR y líneas celulares. Las células y líneas celulares pueden ser obtenidas a partir de cualquier mamífero, pero preferiblemente serán de fuentes humanas u otros primates, caninos, o roedores. Las células que contienen ODAR tales como los osteoclastos pueden ser enriquecidas a partir de otros tipos de células por cromatografía de afinidad usando procedimientos públicamente disponibles. La adhesión de la proteína de unión a OPG a células que llevan ODAR se evalúa en presencia o ausencia de compuestos de ensayo y el grado de unión puede ser determinado, por ejemplo, por citometría de flujo utilizando un anticuerpo biotinilado a la proteína de unión a OPG. De forma alternativa, un cultivo de osteoclastos de ratón o humano puede ser establecido como se describe en el Ejemplo 8 y los compuestos de ensayo pueden ser evaluados por su capacidad de bloquear la maduración de osteoclastos estimulada por la adición de la proteína de unión a OPG y CSF-1. Pueden ser usados ensayos del cultivo celular ventajosamente para evaluar además los compuestos que cuentan en positivo en los ensayos de unión de proteína descritos anteriormente.

Los compuestos que aumentan o disminuyen la interacción de la proteína de unión a OPG con ODAR también pueden ser evaluados respecto a la actividad *in vivo* por la administración de los compuestos a ratones seguido de las medidas de la densidad ósea usando densitometría de exploración ósea o radiografías. Los procedimientos para medir la densidad ósea se describen en la publicación PCT WO97/23614 y en el Ejemplo 13.

La invención proporciona compuestos que disminuyen o bloquean la interacción de la proteína de unión a OPG y ODAR y que son antagonistas de la formación de osteoclastos. Tales compuestos generalmente se dividen en dos grupos. Un grupo incluye los compuestos que son derivados de la proteína de unión a OPG o que interactúan con la proteína de unión a OPG. Éstos se han descrito anteriormente. Un segundo grupo incluye los compuestos que son derivados de ODAR o que interactúan con ODAR. Los ejemplos de los compuestos que son antagonistas de ODAR incluyen ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos o compuestos orgánicos de pequeño peso molecular.

Los antagonistas de ODAR pueden ser compuestos que se unen en o cerca de uno o varios sitios de unión para OPG bp en el dominio extracelular de ODAR y que disminuyen o bloquean completamente la formación del complejo. Aquellas regiones sobre el ODAR que están implicadas en la formación del complejo con la proteína de unión a OPG pueden ser identificadas por analogía con la estructura del complejo homólogo TNF β /TNF-R55 que se ha descrito en Banner *et al.* (*Cell* **73**, 431-445 (1993)). Por ejemplo, la estructura del complejo TNF β /TNF-R55 puede ser usada para identificar las regiones de la proteína de unión a OPG y ODAR que están implicadas en la formación del complejo. Pueden ser diseñados compuestos entonces que se unan preferencialmente a las regiones implicadas en la formación del complejo y que actúen como antagonistas. En un enfoque expuesto en adelante en el Ejemplo 11, fueron diseñados antígenos de péptido para uso en la generación de anticuerpos frente a la proteína de unión a OPG que actúan como antagonistas. Se espera que estos anticuerpos se unan a la proteína de unión a OPG y bloqueen la formación del complejo con ODAR. En un enfoque similar, pueden ser usados antígenos de péptido basados en la estructura de ODAR para generar anticuerpos anti-ODAR que actúen como antagonistas.

También pueden unirse antagonistas de ODAR a ODAR en posiciones distintas del(de los) sitio(s) de unión para OPG bp e inducir cambios conformacionales del polipéptido de ODAR que causen una formación del complejo disminuida o no productiva con proteínas de unión de OPG.

En una realización, un antagonista es una forma soluble de ODAR que carece de un dominio de transmembrana funcional. Las formas solubles de ODAR pueden tener una delección de uno o varios aminoácidos en el dominio de transmembrana (aminoácidos 214-234 como se muestra en las Figuras 10A-F). Los polipéptidos de ODAR solubles pueden tener parte o todo el dominio extracelular y son capaces de unirse a la proteína de unión a OPG. Opcionalmente, el ODAR soluble puede ser parte de una proteína quimérica, en la que parte o todo el dominio extracelular de

ODAR se fusiona a una secuencia de aminoácidos heteróloga. En una realización, la secuencia de aminoácidos heteróloga es una región Fc de IgG humana.

Pueden ser usados moduladores (agonistas y antagonistas) de ODAR para prevenir o tratar la osteopenia, incluyendo osteoporosis, osteomielitis, hipercalcemia de malignidad, osteopenia producida por cirugía o administración de esteroides, enfermedad de Paget, osteonecrosis, pérdida ósea debida a artritis reumatoide, pérdida ósea periodontal, inmovilización, aflojamiento protésico y metástasis osteolítica. Los agonistas y los antagonistas de ODAR usados para el tratamiento de la osteopenia pueden ser administrados solos o en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que promueva el crecimiento óseo incluyendo los factores morfogénicos óseos denominados de BMP-1 a BMP-12, factor β de crecimiento transformante y miembros de la familia TGF- β , los factores de crecimiento de fibroblasto de FGF-1 a FGF-10, inhibidores de interleuquina-1, inhibidores de TNF α , hormona paratiroidea, prostaglandinas de la serie E, bisfosfonatos, estrógenos, SERMs y minerales potenciadores óseos tales como fluoruro y calcio. Los antagonistas de ODAR son particularmente útiles en el tratamiento de la osteopenia.

Los Ejemplos siguientes son ofrecidos para ilustrar más ampliamente la invención, pero no se interpretan como una limitación de su alcance.

15 Ejemplo 1

Identificación de una fuente de línea celular para una proteína de unión a OPG

La osteoprotegerina (OPG) regula negativamente la osteoclastogenesis *in vitro* e *in vivo*. Ya que la OPG es una proteína relacionada con TNFR, probablemente interactúa con un miembro de la familia relacionado con TNF mediando sus efectos. Con una excepción, todos los miembros conocidos de la superfamilia de TNF son proteínas transmembrana tipo II expresadas en la superficie celular. Para identificar una fuente de una proteína de unión a OPG, fueron usadas proteínas de fusión OPG-Fc recombinantes como inmunosondas para seleccionar proteínas de unión de OPG localizadas en la superficie de varias líneas celulares y células hematopoyéticas primarias.

Las líneas celulares que crecieron como cultivos adherentes *in vitro* fueron tratadas usando los métodos siguientes: Las células fueron colocadas en placas de un cultivo de tejido de 24 pocillos (Falcon), luego se les permitió crecer hasta una confluencia de aproximadamente el 80%. El medio de crecimiento entonces fue retirado, y los cultivos adherentes fueron lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco) que contenía suero de becerro fetal del 1% (FCS). Fueron diluidas individualmente proteínas de fusión recombinantes OPG [22-194]-Fc de ratón y OPG [22-201]-Fc de humano (véase el documento de EE.UU. N° 08/706.945 presentado el 3 de Septiembre de 1996) en 5 μ g/ml en PBS que contenía 1% de FCS, luego fueron añadidas a los cultivos y se las dejó incubar durante 45 minutos a 0°C. La solución de la proteína de fusión OPG-Fc fue desechada, y las células fueron lavadas en solución PBS-FCS como se describe anteriormente. Los cultivos entonces fueron expuestos a anticuerpo secundario de IgG antihumano de F(ab') de cabra conjugado con ficoeritrina (N° de cat. de Southern Biotechnology Associates 2043-09) diluido en PBS-FCS. Después de una incubación de 30-45 minutos a 0°C, la solución fue desechada, y los cultivos fueron lavados como se describe anteriormente. Las células entonces fueron analizadas por microscopía inmunofluorescente para detectar las líneas celulares que expresaban una proteína de unión a OPG de superficie celular.

Fueron analizados cultivos de células en suspensión de una manera similar con las modificaciones siguientes: El diluyente y el tampón de lavado consistió en solución salina tamponada con fosfato sin calcio ni magnesio que contenía 1% de FCS. Las células fueron cultivadas para replicar exponencialmente cultivos en el medio de crecimiento, fueron granuladas por centrifugación, y luego fueron resuspendidos en 1×10^7 células/ml en una placa de cultivo de tejido de microtítulo de 96 pocillos (Falcon). Las células fueron expuestas secuencialmente a proteínas de fusión OPG-Fc recombinantes, después al anticuerpo secundario como se describe anteriormente, y las células fueron lavadas por centrifugación entre cada etapa. Las células entonces fueron analizadas por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando un FACscan de Becton Dickinson.

Usando este enfoque, la línea celular mielomonocítica 32D murina (N° de catálogo ATCC CRL-11346) fue encontrada que expresaba una molécula superficial que podía ser detectada tanto con proteínas de fusión de OPG [22-194]-Fc de ratón como con OPG [22-201]-Fc de humano. El anticuerpo secundario solo no se unía a la superficie de células 32D, ni al IgG1 Fc humano purificado, indicando que la unión de las proteínas de fusión de OPG-Fc era debida al resto de OPG. Esta unión podría ser competida en una manera dependiente de la dosis por la adición de la proteína OPG [22-401] recombinante murino o humano. Así la región de OPG requerida para su actividad biológica es capaz de unirse específicamente a una molécula de la superficie derivada de 32-D.

Ejemplo 2

Clonación de la expresión de una proteína de unión a OPG murina

Una genoteca de cADN fue preparada a partir de mRNA de 32D, y fue ligada en el vector de expresión de mamífero pcADN3.1 (+) (Invitrogen, San Diego, CA). Exponencialmente el crecimiento de células 32D mantenidas en presencia de interleuquina-3 recombinante fue cultivado, y el ARN de célula total fue purificado por la extracción de tiocianato de ácido guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159, (1987)). La fracción

de mRNA de poli (A+) fue obtenida a partir de la preparación de ARN total por la adsorción y elución a Dynabeads Oligo (dT) 25 (DynaL Corp.) usando los procedimientos recomendados por el fabricante. Una genoteca de cADN cebado de oligo-dT direccional fue preparada usando el Sistema de Plásmido Superscript (Gibco BRL, Gaithersburg, Md) usando los procedimientos recomendados por el fabricante. El cADN resultante fue digerido hasta la terminación con endonucleasa de restricción de Sal I y Not I, después fue fraccionado por cromatografía del gel de exclusión por tamaño. Las fracciones de peso moleculares más altas fueron seleccionadas, y luego fueron ligadas en la región del polienlazante del vector del plásmido pcADN3.1 (+) (Invitrogen, San Diego, CA). Este vector contiene el promotor CMV corriente arriba del sitio de clonación múltiple, y dirige la expresión a alto nivel en células eucariotas. La genoteca entonces fue electroporada en *E. coli* competente (ElectroMAX DH10B, Gibco, Nueva York), y fue titulada en agar LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina. La genoteca entonces fue ordenada en grupos segregados que contenían aproximadamente 1000 clones/grupo, y cultivos de 1,0 ml de cada grupo fueron cultivados durante 16-20 h a 37°C. El ADN del plásmido de cada cultivo fue preparado usando el Kit 96 Ultra Plasmid de Qiagen Qiawell (N° de catálogo 16191) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante.

Los grupos ordenados de la genoteca de expresión de cADN 32D fueron lipofectados individualmente en cultivos de COS 7, luego fueron analizados respecto a la adquisición de una proteína de unión a OPG de superficie celular. Para hacer esto, fueron colocadas células COS-7 en placas a una densidad de 1×10^6 por ml en placas de cultivo de tejido de seis pocillos (Costar), después fueron cultivados de la noche a la mañana en DMEM (Gibco) que contenía 10% de FCS. Aproximadamente, 2 g de ADN de plásmido de cada grupo fueron diluidos en 0,5 ml de DMEM sin suero, luego fueron esterilizados por centrifugación a través de una columna Spin-X de 0,2 µm (Costar). Simultáneamente, fueron añadidos 10 µl de Lipofectamina (N° de Cat. de Life Technologies 18324-012) en un tubo separado que contenía 0,5 ml de DMEM sin suero. El ADN y las soluciones de Lipofectamina fueron mezclados, y se dejó incubar a TA durante 30 minutos. Los cultivos de células COS 7 entonces fueron lavados con DMEM sin suero, y los complejos de ADN-lipofectamina fueron expuestos a cultivos durante 2-5 h a 37°C. Después de este período, el medio fue eliminado, y fue sustituido con DMEM que contenía 10% de FCS. Las células fueron después cultivadas durante 48 h a 37°C.

Para detectar cultivos que expresen una proteína de unión a OPG, el medio de crecimiento fue eliminado, y las células fueron lavadas con solución de PBS-FCS. Un volumen de 1,0 ml de PBS-FCS que contenía 5 µg/ml de proteína de fusión OPG[22-201]-Fc humana fue añadido a cada pocillo y fue incubado a TA durante 1 h. Las células fueron lavadas tres veces con una solución de PBS-FCS, y luego fueron fijadas en PBS que contenía 2% de paraformaldehído y 0,2% de glutaraldehído en PBS a TA durante 5 minutos. Los cultivos fueron lavados una vez con PBS-FCS, luego fueron incubados durante 1 h a 65°C sumergidos en solución de PBS-FCS. Se dejó a los cultivos enfriarse, y la solución de PBS-FCS fue aspirada. Los cultivos entonces fueron incubados con un anticuerpo (Fc específico) de IgG antihumano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA Producto N° A-9544) a TA durante 30 minutos, luego fueron lavados tres veces con Tris-Cl 20 mM (pH 7,6), y NaCl 137 mM. Los complejos inmunes que se formaron durante estas etapas fueron detectados analizando la actividad de fosfatasa alcalina usando el Kit Fast Red TR/AS-MX Substrate Kit (Pierce, N° de Cat. 34034) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante.

Usando este enfoque, fueron seleccionados un total de aproximadamente 300.000 clones de cADN de 32D independientes, representados por 300 grupos transfectados de 1000 clones cada uno. Un solo pocillo fue identificado que contenía células que adquirieron la capacidad de ser específicamente marcadas por la proteína de fusión OPG-Fc. Este grupo fue subdividido por rondas secuenciales de selección de parentesco, proporcionando un clon de plásmido simple 32D-F3 (Figuras 1A-F). El ADN del plásmido 32D-F3 entonces fue transfectado en células COS-7, que fueron inmunoteñidas con anticuerpo secundario de IgG antihumano de cabra FITC-conjugado solo, proteína de fusión OPG [22-201]-Fc humano más secundario, o con la proteína de fusión ATAR-Fc (ATAR también conocida como HVEM; Montgomery *et al. Cell* **87**, 427-436 (1996)) (Figuras 2A-C). El anticuerpo secundario solo no se unió a células COS-7/32D-F3, ni lo hizo a la proteína de fusión ATAR-Fc. Sólo la proteína de fusión OPG Fc se unió a las células COS-7/32D-F3, indicando que 32D-F3 codificaba una proteína de unión a OPG mostrada en la superficie de las células de expresión.

Ejemplo 3

Secuencia de la proteína de unión a OPG

El clon 32D-F3 aislado anteriormente contenía un inserto de cADN de aproximadamente 2,3 kb (Figura 1), que fue secuenciado en ambas direcciones en un secuenciador de ADN automatizado 373A de Applied Biosystems usando reacciones cebador-colorante Taq conducido-terminador (Applied Biosystems) siguiendo los procedimientos recomendados por el fabricante. La secuencia de nucleótidos resultante obtenida fue comparada con la base de datos de la secuencia de ADN usando el programa FASTA (GCG, Universidad de Wisconsin), y fue analizada respecto a la presencia de marcos de lectura abiertos largos (de LORF) utilizando la aplicación de "marco de lectura abierto de seis vías" (Frames) (GCG, Universidad de Wisconsin). Un LORF de 316 restos de aminoácidos (aa) comenzando en metionina fue detectado en la orientación apropiada, y fue precedido por una región 5' no traducida de aproximadamente 150 bp. La región 5' no traducida contenía un codon de terminación en marco corriente arriba del codon de iniciación predicho. Esto indica que la estructura del plásmido de 32D-F3 es compatible con su capacidad para utilizar la región del promotor CMV para dirigir la expresión de un producto génico de 316 aa en células de mamífero.

La secuencia de la proteína de unión a OPG predicha fue comparada entonces con la base de datos existente de secuencias de proteínas conocidas usando una versión modificada del programa FASTA (Pearson, *Meth. Enzymol.* **183**, 63-98 (1990)). La secuencia de aminoácidos también fue analizada respecto a la presencia de motivos específicos conservados en todos los miembros conocidos de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) usando el método del perfil de secuencia de (Gribskov *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4355-4359 (1987)), según se modifica por Lüethy *et al. Protein Sci.* **3**, 139-146 (1994)). Parecía que había una homología significativa en todas partes de la proteína de unión a OPG con varios miembros de la superfamilia de TNF. La proteína de unión a OPG de ratón parece ser la más estrechamente emparentada con los homólogos de ratón y humano tanto del ligando de TRAIL como de CD40. Otros análisis de la secuencia de la proteína de unión a OPG indicaron una fuerte coincidencia con la superfamilia de TNF, con un valor Z altamente significativa de 19,46.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a OPG contiene un dominio transmembrana hidrófobo probable que comienza en un M49 y se extiende a L69. Basado en esta configuración relativa al codón de inicio de metionina, la proteína de unión a OPG se predice que es de una proteína transmembrana tipo II, con un dominio intracelular del extremo N-terminal corto, y un dominio extracelular del extremo C-terminal más largo (Figuras 4A-F). Esto sería similar a todos los miembros de la familia de TNF conocidos, a excepción de la linfotóxina alfa (Nagata y Golstein, *Science* **267**, 1449-1456 (1995)).

Ejemplo 4

Expresión del mRNA de la proteína de unión a OPG humana

Fueron sondadas transferencias de Northern de tejido humano múltiple (Clontech, Palo Alto, CA) con un fragmento de restricción de 32D-F3 marcado con ³²P-dCTP para detectar el tamaño de la transcripción humana y determinar los modelos de expresión. Los transferencias de Northern fueron prehibridadas en 5X SSPE, 50% de formamida, solución de Denhardt 5X, 0,5% de SDS, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado durante 2-4 h a 42°C. Las transferencias entonces fueron hibridadas en 5X SSPE, 50% de formamida, solución de Denhardt 2X, 0,1% de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y 5 ng/ml de sonda marcada durante 18-24 h a 42°C. Las transferencias entonces fueron lavadas en 2X SSC durante 10 minutos a TA, 1X SSC durante 10 minutos a 50°C, luego en 0,5X SSC durante 10-15 minutos.

Usando una sonda derivada del cADN de ratón y la hibridación bajo condiciones rigurosas, fue detectada una especie de mRNA predominante con una masa molecular relativa de aproximadamente 2,5 kb en nodos de linfa (Figura 3). Una señal débil también fue detectada en la misma masa molecular relativa en mRNA de hígado fetal. No fueron detectadas transcripciones de la proteína de unión a OPG en los otros tejidos examinados. Los datos sugieren que la expresión de mRNA de proteína de unión a OPG fue restringida extremadamente en tejidos humanos. Los datos también indican que el clón de cADN aislado está muy cerca del tamaño de la transcripción natal, sugiriendo que 32D-F3 es un clon de longitud completa.

Ejemplo 5

Clonación molecular de la proteína de unión a OPG humana

El homólogo humano de la proteína de unión a OPG se expresa como un mRNA de aproximadamente 2,5 kb en nodos de linfa periféricos humanos y se detecta por la hibridación con una sonda de cADN de ratón en condiciones de hibridación rigurosas. El ADN que codifica la proteína de unión a OPG humana es obtenido seleccionando una genoteca de cADN de nodo de linfa humano mediante placa de bacteriófago recombinante, o colonia bacteriana transformada, métodos de hibridación (Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, Nueva York (1989)). A esto se rastrea la genoteca de cADN del bacteriófago o del plásmido usando sondas radiactivamente marcadas derivadas del clon de la proteína de unión a OPG 32D-F3 murina. Las sondas son usadas para rastrear el filtro de nitrocelulosa generado a partir de una genoteca en placa. Estos filtros son prehibridados y luego hibridados usando las condiciones especificadas en el Ejemplo 4, dando lugar en última instancia a los clones purificados del cADN de la proteína de unión a OPG humana. Los insertos obtenidos a partir de cualquier clón de la proteína de unión a OPG humana serían secuenciados y analizados como se describe en el Ejemplo 3.

Un ARN de Poli A+ de nodo de linfa humano (Clontech, Inc., Palo Alto, CA) fue analizado respecto a la presencia de transcripciones de OPG-bp como anteriormente en el documento de EE.UU. Nº 08/577.788, presentado el 22 de Diciembre de 1995. Una transferencia Northern de esta muestra de ARN sondada en condiciones rigurosas con una sonda de OPG-bp de ratón ³²P-marcada indicó la presencia de transcripciones de OPG-bp humano. Una genoteca de cADN dT-cebada de oligo entonces fue sintetizada a partir del mRNA de nodo de linfa usando el kit de SuperScript (GIBCO Life Technologies, Gaithersberg, MD) como se describe en el Ejemplo 2. El cADN resultante fue seleccionado por tamaños, y la fracción molecular alta ligada al vector del plásmido pcADN 3.1 (+) (Invitrogen, San Diego, CA). Fueron transformadas DH10 de *E. coli* electrocompetentes (GIBCO Life Technologies, Gaithersberg, MD), y fueron seleccionados 1×10^6 transformantes resistentes a ampicilina por la hibridación de colonias usando una sonda de la proteína de unión a OPG de ratón ³²P-marcada.

Un clón de plásmido de cADN de la supuesta proteína de unión a OPG humana fue aislado, phuOPGbp-1.1, y contenía un inserto de 2,3 kb. La secuencia del nucleótido resultante del inserto de phuOPGbp-1.1 fue aproximadamen-

te 80-85% homólogo con la secuencia de cADN de la proteína de unión a OPG de ratón. La traducción de la secuencia de ADN de inserto indicó la presencia de un marco de lectura abierto largo predicho para codificar un polipéptido de 317 aa (Figuras 4A-F). La comparación de los polipéptidos de OPG-bp de ratón y humano muestra que son ~87% idéntico, indicando que esta proteína está altamente conservada durante la evolución.

- 5 El ADN de la proteína de unión a OPG humano y las secuencias de proteína no estaban presentes en la el Genbank, y no había ninguna secuencia de EST homóloga. Como con el homólogo murino, la proteína de unión a OPG humana muestra una fuerte semejanza de secuencia para todos los miembros de la superfamilia de TNF α de citoquinas.

Ejemplo 6

10 Clonación y expresión bacteriana de la proteína de unión a OPG

La amplificación por PCR empleando los pares de cebador y plantillas descritas más abajo son usadas para generar varias formas de proteínas de unión de OPG murinas. Un cebador de cada par introduce un codon de terminación TAA y un sitio único XhoI o SacII después del término carboxi del gen. El otro cebador de cada par introduce un sitio único NdeI, una metionina del extremo N-terminal, y codones optimizados para la parte del extremo amino terminal del gen. La PCR y el termociclado se realizan usando la metodología del ADN estándar recombinante. Los productos de la PCR se purifican, se digieren por restricción, y se insertan en los sitios únicos NdeI y XhoI o SacII del vector pAMG21 (N° del catálogo ATCC 98113) y se transforman en 393 o 2596 de *E. Coli* prototrófico. Otros vectores de expresión de *E. coli* y células huésped comúnmente usadas son también adecuados para la expresión. Después de la transformación, los clones son seleccionados, el ADN del plásmido es aislado y se confirma la secuencia del inserto de la proteína de unión a OPG.

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [75-316]

Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 242 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met (75)-Asp-Pro-Asn-Arg-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR fue pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1581-72 y N° 1581-76 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1581-72:

5' -GTTCTCCTCATATGGATCCAAACCGTATTTCTGAAGACAGCACTCACTGCTT-3'

(SEQ ID NO: 5)

1581-76:

5' -TACGCACTCCGCGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'

(SEQ ID NO: 6)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [95-316]

Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 223 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-His (95)-Glu-Asn-Ala-Gly-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR fue pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1591-90 y N° 1591-95 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1591-90:

5' -ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCATGAAAACGCAGGTCTGCAG-3'

(SEQ ID NO: 7)

1591-95:

5' -TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3'

(SEQ ID NO: 8)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [107-316]

Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 211 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-Ser (107)-Glu-Asp-Thr-Leu-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR fue pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1591-93 y N° 1591-95 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1591-93:

5' -ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGTCTGAAGACACTCTGCCGGACTCC-3'
(SEQ ID NO:9)

1591-95:

5' -TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCTGAACTTTGAA-3'
(SEQ ID NO:10)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [118-316]

5 Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 199 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met (118)-Lys-Gln-Ala-Phe-Gln-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR fue pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1591-94 y N° 1591-95 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1591-94:

5' -ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAACAAGCTTTTCAGGGG-3'
(SEQ ID NO:11)

1591-95:

5' -TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCTGAACTTTGAA-3'
(SEQ ID NO:12)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [128-316]

10 Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 190 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-Lys (128)-Glu-Leu-Gln-His-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR fue pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1591-91 y N° 1591-95 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1591-91:

5' -ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAAGAAGTGCAGCACATTGTG-3'
(SEQ ID NO:13)

1591-95:

5' -TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCTGAACTTTGAA-3'
(SEQ ID NO:14)

15 Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [137-316]

Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 181 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-Gln (137)-Arg-Phe-Ser-Gly-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR fue pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1591-92 y N° 1591-95 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1591-92:

5' -ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCAGCGTTTCTCTGGTGCTCCA-3'
(SEQ ID NO:15)

1591-95:

20 5' -TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCTGAACTTTGAA-3'
(SEQ ID NO:16)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [146-316]

25 Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 171 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met (146)-Glu-Gly-Ser-Trp-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR es la proteína de unión a OPG pAMG21-murina [75-316] descrita anteriormente y los oligonucleotidos N° 1600-98 y N° 1581-76 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1600-98:

5' - GTTCTCCTCATATGGAAGGTTCTTGGTTGGATGTGGCCCA-3'
(SEQ ID NO:17)

1581-76:

5' -TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'
(SEQ ID NO:18)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [156-316]

5 Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 162 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-Arg (156)-Gly-Lys-Pro-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR es la proteína de unión a OPG pAMG21-murina [158-316] más abajo y los oligonucleotidos N° 1619-86 y N° 1581-76 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1619-86:

5' - GTTCTCCTCATATGCGTGGTAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCA-3'
(SEQ ID NO:19)

1581-76:

5' -TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'
(SEQ ID NO:20)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [158-316]

10 Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 160 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-Lys (158)-Pro-Glu-Ala-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR fue pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1581-73 y N° 1581-76 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1581-73:

5' -GTTCTCCTCATATGAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCACACCTCACCATCAAT-3'
(SEQ ID NO:21)

1581-76:

5' -TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'
(SEQ ID NO:22)

Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [166-316]

15 Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 152 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-His (166)-Leu-Thr-Ile-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR es pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1581-75 y N° 1581-76 fueron el par de cebador usado para la PCR y la clonación de esta construcción génica.

1581-75:

5' -GTTCTCCTCATATGCATTTAACTATTAACGCTGCATCTATCCCAT
CGGGTTCCCATAAAGTCACT-3' (SEQ ID NO:23)

1581-76:

5' -TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3' (SEQ ID NO:24)

20 Proteína de unión a OPG pAMG21-murina [168-316]

Esta construcción fue modificada genéticamente para tener 150 aminoácidos de longitud y tener los siguientes restos del extremo N-terminal y C-terminal, NH₂-Met-Thr (168)-Ile-Asn-Ala-----Gln-Asp-Ile-Asp (316)-COOH. La plantilla usada para la PCR es pcADN/32D-F3 y los oligonucleotidos N° 1581-74 y N° 1581-76 serán el par de cebador que se use para la PCR y la clonación.

1581-74:

5' -GTTCTCCTCATATGACTATTAACGCTGCATCTATCCCATCGGGTCCCATAAAGTCACT-3'

(SEQ ID NO:25)

1581-76:

5' -TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3' (SEQ ID NO:26)

Se entiende que las construcciones anteriores son ejemplos y que un experto en la técnica puede obtener fácilmente otras formas de la proteína de unión a OPG usando la metodología general presentada en este documento.

5 Las construcciones bacterianas recombinantes pAMG21- proteína de unión a OPG murina [75-316], [95-316], [107-316], [118-316], [128-316], [137-316], y [158-316] han sido clonadas, la secuencia de ADN confirmada, y se han examinado los niveles de expresión del producto génico recombinante después de la inducción. Todas las construcciones produjeron niveles del producto génico recombinante que fueron fácilmente visibles siguiendo la electroforesis de gel de poliacrilamida SDS y tinción de coomassie de lisados a granel. El crecimiento de 393 o 2596 de *E. coli* transformado, la inducción de la expresión de la proteína de unión a OPG y el aislamiento de cuerpos de inclusión que contenían la proteína de unión a OPG se hace de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento PCT WO97/23614. La purificación de las proteínas de unión de OPG de cuerpos de inclusión requiere la solubilización y la renaturalización de la proteína de unión a OPG usando procedimientos disponibles para un experto en la técnica. La proteína de unión a OPG recombinante murina [158-316] fue encontrada que era producida sobre todo insolublemente, pero fue encontrada aproximadamente el 40% en la fracción soluble. La proteína recombinante fue purificada a partir de la fracción soluble como se describe más abajo y fue examinada su bioactividad.

Ejemplo 7

Purificación de la proteína de unión a OPG recombinante murina [158-316]

20 Fueron descongeladas células bacterianas congeladas que contenían la proteína de unión a OPG murina (158-316) expresada y fueron resuspendidas en tris-HCl 20 mM, pH 7,0, EDTA 10 mM. La suspensión celular (20% p/v) entonces fue homogeneizada por tres pasos a través de un microfluidizador. La suspensión celular lisada fue centrifugada en un rotor JA14 a 10.000 revoluciones por minuto durante 45 minutos. El análisis de SDS-PAGE mostró una banda de aproximadamente 18 kd de peso molecular presente tanto en cuerpos de inclusión como en el sobrenadante. La fracción soluble fue aplicada después a una columna Sepharose 4FF SP de Pharmacia equilibrada con MES 10 mM pH 6,0. La proteína de unión a OPG fue eluida con un gradiente de volumen de columna 20 de NaCl 0-0,4M en MES pH 6,0. Las fracciones que contenían la proteína de unión a OPG entonces fueron aplicadas a una columna Bakerbond de ABX equilibrada con MES 20 mM, pH 6,0. La proteína de unión a OPG fue eluida con un gradiente 15CV de NaCl 0-0,5M en MES, pH 6,0. El producto final era más del 95% homogéneo en SDS-PAGE. La secuenciación del extremo N-terminal dio la secuencia siguiente: Met-Lys-Pro-Glu-Ala-Gln-Pro-Phe-Ala-His que fue identificada con la predicha para un polipéptido que comienza en el resto 158 (con una metionina iniciador). El peso molecular relativo de la proteína durante la SDS-PAGE no cambia en la reducción.

Ejemplo 8

Bioactividad de la proteína de unión a OPG recombinante soluble *in vitro*

35 La proteína de OPG recombinante se ha mostrado previamente que bloquea la formación de osteoclastos dependiente de la vitamina D3 a partir de precursores de la médula ósea y del bazo en un ensayo formador de osteoclastos como se describe en el documento de EE.UU. N° 08/577.788. Ya que la proteína de unión a OPG se une a OPG, y es un nuevo miembro de la familia de TNF de ligandos, es un objetivo potencial de la bioactividad de OPG. La proteína de unión a OPG soluble recombinante (158-316), que representa el mínimo dominio tipo TNF α principal, fue analizada por su capacidad de modular la diferenciación de osteoclastos a partir de precursores de osteoclastos. Las células de la médula ósea fueron aisladas a partir de fémures de ratón adulto, y fueron tratadas con M-CSF. La fracción no adherente fue co-cultivada con células ST2 en presencia y ausencia tanto de vitamina D3 como de dexametasona. Como se muestra antes, los osteoclastos se desarrollan sólo a partir de co-cultivos que contenían células estromales (ST2), vitamina D3 y dexametasona. La proteína de unión a OPG recombinante soluble fue añadida en concentraciones variables en el intervalo de 0,16 a 500 ng/ml y la maduración de osteoclastos fue determinada por un ensayo de solución de TRAP y por observación visual. La proteína de unión a OPG estimuló fuertemente la diferenciación de osteoclastos y la maduración de una manera dependiente de la dosis, con efectos semi-máximos en el intervalo de 1-2 ng/ml, sugiriendo que esto actúa como un inductor potente de la osteoclastogénesis *in vitro* (Figura 5). El efecto de la proteína de unión a OPG es bloqueado por el OPG recombinante (Figura 6).

50 Para analizar si la proteína de unión a OPG podía sustituir el estroma y los esteroides añadidos, fueron hechos cultivos usando M-CSF a concentraciones variables para promover el crecimiento de precursores de osteoclastos y fueron añadidas varias cantidades de la proteína de unión a OPG también. Como se muestra en la Figura 6, la dosis de la proteína de unión a OPG estimuló dependientemente la actividad de TRAP, y la magnitud de la estimulación fue dependiente del nivel de M-CSF añadido sugiriendo que estos dos factores juntos son críticos para el desarrollo

de osteoclastos. Para confirmar la importancia biológica de esta última observación, fueron hechos cultivos en cortes óseos corticales bovinos y fueron analizados los efectos de M-CSF y la proteína de unión a OPG solos o juntos. Como se muestra en las Figuras 7A-C, la proteína de unión a OPG en presencia de M-CSF estimulaba la formación de grandes osteoclastos positivos TRAP que erosionaban la superficie ósea causando hoyos. Así, la proteína de unión a OPG actúa como un factor estimulante de la osteoclastogénesis (diferenciación). Esto sugiere que el OPG bloquea el desarrollo de osteoclastos secuestrando la proteína de unión a OPG.

Ejemplo 9

Actividad *in vivo* de la proteína de unión a OPG soluble recombinante

Basado en estudios *in vitro*, la proteína de unión a OPG recombinante murina [158-316] producida en *E.coli* es un potente inductor del desarrollo de osteoclastos a partir de precursores mieloides. Para determinar sus efectos *in vivo*, ratones macho BDF1 de 4-5 semanas (Laboratorios Charles River) recibieron inyecciones subcutáneas de la proteína de unión a OPG [158-316] dos veces al día durante tres días y en la mañana del cuarto día (días 0, 1, 2, y 3). Cinco grupos de ratones (n = 4) recibieron solo vehículo, o 1, 5, 25 ó 100 µg/día de la proteína de unión a OPG [158-316]. 5 grupos adicionales de ratones (n = 4) recibieron las dosis anteriores de vehículo o de la proteína de unión a OPG [158-316] y además recibieron 1 mg/Kg/día (aproximadamente 20 µg/día) de Fc-OPG [22-194] humano mediante una sola inyección subcutánea diaria. Fue determinado el calcio ionizado de sangre entera antes del tratamiento el día 0 y 3-4 horas después de la primera inyección diaria de la proteína de unión a OPG [158-316] los días 1, 2, y 3. Cuatro horas después de la última inyección el día 3 los ratones fueron sacrificados y fueron tomadas radiografías.

El recombinante de la proteína de unión a OPG [158-316] produjo un aumento significativo del calcio ionizado en sangre después de dos días de tratamiento con una dosis de 5 µg/día y más alta (Figura 8). La severidad de la hipercalemia indica una potente inducción de la actividad de osteoclastos lo que causa un aumento de la resorción ósea. La administración de OPG simultánea limitó la hipercalemia a una dosis de la proteína de unión a OPG [158-316] de 5 y 25 µg/día, pero no a 100 µg/día. Estos mismos animales fueron analizados por radiografía para determinar si había algún efecto sobre la densidad del mineral óseo visible por rayos X (Figuras 9A-D). El recombinante de la proteína de unión a OPG [158-316] inyectado durante 3 días disminuyó la densidad ósea en la tibia proximal de ratones en una manera dependiente de la dosis. La reducción de la densidad ósea fue particularmente evidente en ratones que recibieron 100 µg/d confirmando que la hipercalemia profunda en estos animales fue producida a partir de una mayor resorción ósea y dando lugar a una liberación del calcio del esqueleto. Estos datos indican claramente que la proteína de unión a OPG [158-316] actúa *in vivo* para promover la resorción ósea, conduciendo a una hipercalemia sistémica, y que el OPG recombinante anula estos efectos.

Ejemplo 10

Clonación y expresión de la proteína de unión a OPG soluble en células de mamífero

El clon de longitud completa de la proteína de unión a OPG murina y humana puede ser expresado en células de mamífero como se describe antes en el Ejemplo 2. De forma alternativa, los clones de cADN pueden ser modificados para codificar las formas secretadas de la proteína cuando se expresan en células de mamífero. Para hacer esto, el extremo 5' natural del cADN que codifica el codón de iniciación, y que se extiende aproximadamente por los 69 primeros aminoácidos de la proteína, incluyendo la región que atraviesa la membrana, podría ser sustituido por una secuencia líder del péptido señal. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican el codón de iniciación y el péptido señal de un gen conocido pueden ser empalmadas a la secuencia de cADN de la proteína de unión a OPG comenzando en cualquier parte después de la región que codifica el resto del aminoácido 68. Se predice que los clones recombinantes resultantes producen formas secretadas de la proteína de unión a OPG en células de mamífero, y que deberían sufrir modificaciones post-translacionales que normalmente ocurren en el dominio extracelular del extremo C-terminal de la proteína de unión a OPG, tal como la glicosilación. Usando esta estrategia, fue construida una forma secretada de la proteína de unión a OPG que tenía en su extremo 5' el péptido señal de OPG murino, y en su extremo 3' el dominio de IgG1 Fc humano. El vector del plásmido pCEP4/muOPG [22-401]-Fc como se describe en el documento de EE.UU. N° 08/577.788, presentado el 22 de Diciembre de 1995, fue digerido con NotI para dividir entre el extremo 3' de OPG y el gen de Fc. El ADN linealizado entonces fue digerido parcialmente con XmnI para dividirse sólo entre los restos 23 y 24 de OPG dejando el extremo ciego. Las digestiones de restricción fueron entonces desfosforiladas con CIP y la parte de vector de esta digestión (incluyendo los restos 1-23 de OPG y Fc) fue purificada por gel.

La región de cADN de la proteína de unión a OPG murina que codifica los restos de los aminoácidos 69-316 fue amplificada por PCR usando la Polimerasa Pfu (Stratagene, San Diego, CA) a partir de la plantilla del plásmido usando los cebadores de los oligonucleótidos siguientes:

1602-61: CCT CTA GGC CTG TAC TTT CGA GCG CAG ATG (SEQ
ID NO: 27)

1602-59: CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG
(SEQ ID NO: 28)

5 El oligonucleotido 1602-61 amplifica el extremo 5' del gen y contiene un sitio *Stu*I artificial. El cebador 1602-59 amplifica el 3' extremo del gen y contiene un sitio *Not*I artificial. El producto PCR resultante obtenido fue digerido con *Not*I y *Stu*I, después fue purificado por gel. El producto de la PCR purificado fue ligado con el vector, luego fue usado para transformar células DH10B de *E. coli* electrocompetentes. El clon resultante fue secuenciado para confirmar la intergridad de la secuencia amplificada y las uniones del sitio de restricción. Este plásmido entonces fue usado para transfectar fibroblastos 293 humanos, y la proteína de fusión proteína de unión a OPG-Fc fue recogida del medio de cultivo de la forma antes descrita en el documento de EE.UU. N° 08/577.788, presentado el 22 de Diciembre de 1995.

10 Usando una estrategia similar, fue diseñado un vector de expresión que fue capaz de expresar un truncamiento del extremo N-terminal fusionado al dominio de IgG1 Fc humano. Estas construcciones consisten en el péptido señal de OPG murino (resto de 1-21 aa), fusionado en marco a los restos de la proteína de unión a OPG 158-316 murina, seguido de una fusión en marco al dominio de IgG1 Fc humano. Para hacer esto, el vector del plásmido pCEP4/OPG murino [22-401] (documento de EE.UU. N° 08/577.788, presentado el 22 de Diciembre de 1995), fue digerido con *Hind*III y *Not*I para eliminar el marco de lectura de OPG entero. Los restos 158-316 de la proteína de unión a OPG murina fueron amplificados por PCR usando de la plantilla del plásmido pCDNA/32D-F3 los cebadores siguientes:

1616-44: CCT CTC TCG AGT GGA CAA CCC AGA AGC CTG AGG
CCC AGC CAT TTG C (SEQ ID NO: 29)

1602-59: CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG
(SEQ ID NO: 30)

20 El 1616-44 amplifica la proteína de unión a OPG comenzando en el resto 158 así como los que contienen los restos 16-21 del péptido señal de μ OPG con un sitio de *Xho*I artificial. El 1602-59 amplifica el extremo 3' del gen y añade un sitio *Not*I en marco. El producto de la PCR fue digerido con *Not*I y *Xho*I y luego fue purificado por gel.

Los siguientes cebadores complementarios fueron hibridados entre sí para formar un adaptador que codificaba el péptido señal de OPG murino y la secuencia Kozak que rodea el sitio de iniciación de la traducción:

1616-41: AGC TTC CAC CAT GAA CAA GTG GCT GTG CTG CGC
ACT CCT GGT GCT CCT GGA CAT CA (SEQ ID NO: 31)

25 1616-42: TCG ATG ATG TCC AGG AGC ACC AGG AGT GCG CAG
CAC AGC CAC TTG TTC ATG GTG GA (SEQ ID NO: 32)

30 Estos cebadores fueron hibridados, generando proyecciones 5' compatibles con *Hind*III en el extremo 5' y *Xho*I en el extremo 3'. El vector digerido anteriormente obtenido, los oligos hibridados, y el fragmento de la PCR digerido fueron ligados juntos y electroporados en células DH10B. El clon resultante fue secuenciado para confirmar la reconstrucción auténtica de la unión entre el péptido señal, el fragmento de la proteína de unión a OPG que codifica los restos 158-316, y el dominio de IgG1 Fc. El plásmido recombinante fue purificado, fue transfectado en fibroblastos 293 humanos, y fue expresado como producto de un medio acondicionado como se describe anteriormente.

35 Fueron clonados cADN de longitud completa murino y humano en el vector de expresión pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA), luego fueron transfectados en cultivos de fibroblastos 293 humanos como se describe en el Ejemplo 1. Los cultivos celulares fueron seleccionados con higromicina como se describe anteriormente y fue preparado medio acondicionado sin suero. El medio acondicionado fue expuesto a una columna de OPG recombinante inmovilizado, y las formas insertadas de OPG bp recombinante murino y humano fueron purificadas por afinidad. El análisis de la secuencia del extremo N-terminal de las proteínas de unión de OPG purificadas solubles indica que la proteína murina se divide preferencialmente antes de la fenilalanina 139, y la proteína humana preferencialmente se divide antes del resto homólogo, isoleucina 140. Además la proteína humana también se divide preferencialmente antes de la glicina 145. Esto sugiere que las formas solubles que se dan naturalmente de la proteína de unión a OPG humana

tienen restos del amino terminal en la isoleucina en la posición 140 o en la glicina en la posición 145.

Ejemplo 11

Péptidos de la proteína de unión a OPG y preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a la proteína

- 5 Pueden ser obtenidos anticuerpos contra las regiones específicas de la proteína de unión a OPG por inmunización con péptidos de la proteína de unión a OPG. Estos péptidos pueden ser usados solos, o pueden ser usadas para la inmunización en formas conjugadas del péptido.

La estructura cristalina del TNF α maduro ha sido descrita [E.Y. Jones, D.I. Stuart, y N.P.C. Walker (1990) *J. Cell Sci. Suppl.* **13**, 11-18] y el monómero forma una estructura sándwich de hoja β antiparalela con una topología de plegamiento en remolino. Diez cadenas β antiparalelas son observadas en esta estructura cristalina y forman una estructura sandwich β con una hoja β que consiste en cadenas B'BIDG y la otra en cadenas C'CHEF [E.Y. Jones *et al.*, *ibíd.*] Dos bucles de TNF α maduro se han implicado a partir de estudios de mutagénesis que hacen contacto con el receptor, siendo éstos los bucles formados entre la cadena β B y B' y el bucle entre las cadenas β E y F [C. R. Goh, C-S. Loh, y A.G. Porter (1991) *Protein Engineering* **4**, 785-791]. La estructura cristalina del complejo formado entre TNF β y el dominio extracelular del receptor de TNF de 55 kd (TNF-R55) ha sido resuelto y se han descrito los contactos receptor-ligando [D.W. Banner, A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H-J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher, y W. Lesslauer (1993) *Cell* **73**, 431-445]. De acuerdo con los estudios de mutagénesis descritos anteriormente [C.R. Goh *et al.*, *ibíd.*] los bucles BB' y EF correspondientes del ligando TNF β fueron encontrados que hacían la mayoría de los contactos con el receptor en la estructura cristalina resuelta del complejo TNF β :TNF-R55. La secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a OPG murina fue comparada con las secuencias de aminoácidos de TNF α y TNF β . Las regiones de la proteína de unión a OPG murina correspondientes a los bucles BB' y EF fueron predichas basado en esta comparación y se han diseñado péptidos y son descritos más abajo:

A. Antígeno(s): La proteína de unión a OPG murina recombinante [158-316] ha sido usada como antígeno (ag) para la inmunización de animales como se describe más abajo, y el suero será examinado usando las estrategias descritas más abajo. Se han sintetizado los péptidos de los supuestos bucles BB' y EF de la proteína de unión a OPG murina y serán usados para la inmunización; estos péptidos son:

péptido del bucle BB' : NH₂--NAASIPSGSHKVTLS^WYHDRGWAKIS--COOH
(SEQ ID NO: 33)

péptido del bucle BB'-Cys: NH₂--NAASIPSGSHKVTLS^WYHDRGWAKISC--COOH
(SEQ ID NO: 34)

péptido del bucle EF: NH₂--VYVVKTSIKIPSSHNLM--COOH (SEQ ID NO: 35)

péptido del bucle EF-Cys: NH₂--VYVVKTSIKIPSSHNLMC--COOH (SEQ ID NO: 35)

Se han usado péptidos con un resto de cisteína del extremo carboxi terminal para la conjugación usando las estrategias descritas en la sección B más abajo, y se han usado para la inmunización.

- 30 B. Conjugación con hemocianina de lapa californiana o albúmina de suero bovino: Pueden ser conjugados péptidos seleccionados o fragmentos de proteína a hemocianina de lapa californiana (HLC) para aumentar su inmunogenicidad en animales. También pueden ser utilizados en el protocolo EIA péptidos conjugados con albúmina de suero bovino (BSA) o fragmentos de proteína. HLC o BSA activado con Inject Maleimida (Compañía Química Pierce, Rockford, IL) es reconstituido en dH₂O hasta una concentración final de 10 mg/ml. Se disuelven los fragmentos peptídicos o proteicos en tampón fosfato mezclado después con una masa equivalente (g/g) de HLC o BSA. Se permite que la conjugación reaccione durante 2 horas a temperatura ambiente (ta) con agitación suave. La solución entonces se pasa a través de una columna destiladora o dializada frente a PBS de la noche a la mañana. El conjugado peptídico se almacena a -20°C hasta que se use en las inmunizaciones o en EIA.

40 C. Inmunización: A ratones Balb/c, (Laboratorios Charles Rivers, Wilmington, MA) ratas Lou, o conejos Blancos de Nueva Zelanda se les inyecta subcutáneamente (SQI) con ag (50 μ g, 150 μ g, y 100 μ g respectivamente) emulsionado en Adyuvante de Freund Completo (CFA, 50% vol/vol; Laboratorios Difco, Detroit, MI). Los conejos entonces son revacunados dos o tres veces en intervalos de 2 semanas con antígeno preparado de la manera similar en Adyuvante de Freund Incompleto (ICFA; Difco Laboratorios, Detroit, MI). Los ratones y las ratas fueron revacunados aproximadamente cada 4 semanas. Siete días después de la segunda revacunación, se realizan sangrías de ensayo y se determinan los títulos del anticuerpo en suero. Cuando se desarrolla el título en conejos, se toma la producción de sangre semanal de 50 mls durante 6 semanas consecutivas. Los ratones y ratas son seleccionados respecto a la producción de hibridoma basado en los niveles de título en suero; se usan los animales con los títulos semi-máximos

mayores a 5000. Un experto en la técnica puede aplicar ajustes a este protocolo; por ejemplo, varios tipos de inmunomoduladores están ahora disponibles y pueden ser incorporados a este protocolo.

5 D. Ensayo inmunosorbente unido a enzima (EIA): Serán realizados EIA para determinar los títulos del anticuerpo en suero (ab) de animales individuales, y más tarde para el rastreo de potenciales hibridomas. Fueron revestidas placas EIA/RIA de microtitulación de 96 pocillos, de alta fijación y de fondo plano (Corporación Costar, Cambridge, MA) con proteína recombinante purificada o fragmento de proteína (antígeno, ag) en 5 µg por ml en tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9,2 (Na₂CO₃ 0,015 M, NaHCO₃ 0,035 M). Pueden ser conjugados fragmentos de proteína con albúmina de suero bovino (BSA) si es necesario. Cincuenta µl de ag serían añadidos a cada pocillo. Las placas entonces serán revestidas con la película de acetato (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA) y serán incubadas a temperatura ambiente (ta) en una plataforma de agitación durante 2 horas o de la noche a la mañana a 4°C. Las placas serán bloqueadas durante 30 minutos a ta con 250 µl por solución de BSA del 5% por pocillo preparada mezclando 1 parte de diluyente de BSA/concentrado de solución de bloqueo (Kirkegaard y Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) con 1 parte de agua desionizada (dH₂O). Habiendo sido desechada la solución de bloqueo, serán añadidos a cada pocillo 50 µl de diluciones 2 veces de suero (de 1:100 a 1:12.800) o sobrenadantes de cultivo de tejido de hibridoma. El diluyente de suero es BSA del 1% (10% de diluyente de BSA/concentrado de solución bloqueante diluido 1:10 en solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco, D-PBS; Gibco BRL, Grand Island, Nueva York) mientras que los sobrenadantes de hibridoma son analizados no diluidos. En el caso del rastreo de hibridoma, es mantenido un pocillo como control conjugado, y un segundo pocillo como control de ab positivo. Las placas se incuban de nuevo a ta, agitando durante 1 hora, luego se lavan 4 veces usando una preparación 1x de concentrado 20x de solución de lavado (Laboratorios Kirkegaard y Perry, Inc., Gaithersburg, MD) en dH₂O. El ab secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Boeringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) diluido en 1% de BSA entonces se incubaba en cada pocillo durante 30 minutos. Las placas se lavan como antes, se secan transferidas, y se añade el sustrato del componente individual de ABTS peroxidasa (Laboratorios Kirkegaard y Perry, Inc., Gaithersburg, MD). La absorbancia se lee a 405 nm para cada pocillo usando un lector de Microplaca EL310 (Instrumentos Bio-tek, Inc., Winooski, VT). El título semi-máximo del anticuerpo en suero se calcula trazando el log₁₀ de la dilución en suero frente a la densidad óptica a 405, extrapolando luego en el punto del 50% de la densidad óptica máxima obtenida por aquel suero. Los hibridomas se seleccionan como positivos si los valores de densidad óptica son mayores que 5 veces por encima de la línea de fondo. Pueden aplicarse ajustes a este protocolo; por ejemplo, puede ser escogido el anticuerpo secundario conjugado por la especificidad o la reactividad no específica.

30 E. Fusión celular: El animal seleccionado para la producción de hibridoma se inyecta intravenosamente con de 50 a 100 µg de ag en PBS. Cuatro días más tarde, el animal se sacrifica con dióxido de carbono y su bazo es recogido en condiciones estériles en 35 ml de Medio Eagle Modificado de Dulbeccos conteniendo 200 U/ml de Penicilina G, 200 µg/ml de Sulfato de Estreptomicina, y glutamina 4 mM (2 x P/S/G DMEM). El bazo se recorta del tejido graso en exceso, luego se aclara a través de 4 platos de 2x P/S/G DMEM limpio. Después se transfiere a una bolsa estomacal estéril (Tekmar, Cincinnati, OH) que contiene 10 ml de 2x P/S/G DMEM y se disgrega en una suspensión celular simple con el Stomacher Lab Blender 80 (Seward Laboratory UAC House; Londres, Inglaterra). Cuando las células se liberan de la cápsula del bazo en el medio, se retiran de la bolsa y se transfieren a un tubo de centrifugadora cónica de 50 ml estéril (Becton Dickinson and Company, Lincoln Park, NJ). El medio recién preparado se añade a la bolsa y el procedimiento es seguido hasta que el contenido de células enteras del bazo se liberan. Estos esplenocitos se lavan 3 veces por centrifugación a 225 x g durante 10 minutos.

45 Simultáneamente, los cultivos en fase log de células de mieloma, Sp2/0-Ag14 o Y3-Ag1.2.3 para fusiones de esplenocito de ratón o rata, respectivamente, (Colección Americana de Cultivos Tipo; Rockville, MD) cultivados en medio completo (DMEM, 10% de suero bovino fetal inactivado, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, y tampón hepes 10 mM; Laboratorios Gibco, Grand Island, Nueva York) se lavan de manera similar. Los esplenocitos se combinan con células de mieloma y se granulan otra vez. El medio se aspira de los peletes de células y se mezcla con cuidado con 2 ml de polietilenglicol 1500 (PEG 1500; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) en las células en el curso de 1 minuto. A partir de entonces, se añade despacio un volumen igual de 2x P/S/G DMEM. Se permite a las células fusionarse a 37°C durante 2 minutos, luego se añaden 6 ml adicionales de 2x P/S/G DMEM. Las células de nuevo son puestas a 37°C durante 3 minutos. Finalmente, se añaden 50 35 ml de 2x P/S/G DMEM a la suspensión celular, y las células se granulan por centrifugación. El medio se aspira del pellet y las células se resuspenden con cuidado en medio completo. Las células se distribuyen en placas de cultivo de fondo plano de tejido de 96 pocillos (Becton Dickinson Labware; Lincoln Park, NJ) mediante gotas individuales con una pipeta de 5 ml. Las placas se incuban de la noche a la mañana en condiciones humedecidas a 37°C, 5% de CO₂. Al día siguiente, se añade un volumen igual de medio de selección a cada pocillo. La selección consiste en hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 4 x 10⁻⁴ mM, y timidina 1,6 x 10⁻² mM en medio completo. Las placas de fusión se incuban durante 7 días seguido de 2 cambios de medio durante los 3 días siguientes; se usa el medio de selección HAT después de cada cambio de fluido. Los sobrenadantes del cultivo de tejido son tomados de 3 a 4 días después del último cambio de fluido de cada pocillo que contiene híbrido y se analizan por EIA respecto a la reactividad del anticuerpo específico. Este protocolo se ha modificado respecto al de Hudson y Hay, "Practical Immunology, Segunda Edición", Publicaciones Científicas Blackwell.

Ejemplo 12

Clonación de un receptor de la proteína de unión a OPG expresada en células precursoras hematopoyéticas

La proteína de unión a OPG recombinante murina biológicamente activa [158-316] fue conjugada con fluoresceína-isotiocianato (FITC) para generar una sonda fluorescente. El marcaje fluorescente fue realizado por la incubación de la proteína de unión a OPG recombinante murina [158-316] con succinimidil-éster del ácido 6-fluoresceín-5-(y 6) carboxiamido-hexanoico (Molecular Probes, Eugene, O) en una relación molar 1:6 durante 12 horas a 4°C. La proteína de unión a OPG FITC-marcada [158-316] además fue purificada por cromatografía de filtración de gel. Fueron aisladas e incubadas células de médula ósea de ratón en un cultivo en presencia de CSF-1 y la proteína de unión a OPG [158-316] como se describe en el Ejemplo 10. Fueron cultivadas células de médula ósea de ratón de la noche a la mañana en CSF-1 (30 ng/ml) y la proteína de unión a OPG [158-316] (20 ng/ml). Fueron eliminadas primero células no adherentes y almacenadas en hielo y fueron eliminadas las células adherentes restantes incubando con tampón de disociación celular (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), fueron reunidas con la población no adherente, y luego fueron teñidas con la proteína de unión FITC-OPG como se describe anteriormente. Después del lavado y la resuspensión en PBS con 0,5% de BSA, las células fueron expuestas a la proteína de unión FITC-OPG, fueron lavadas, y después fueron clasificados por FACS. La población de células que fueron positivas por teñirse con la proteína de unión FITC-OPG fue recogida y el mRNA fue aislado como se describe en el Ejemplo 2. Esta preparación de mRNA fue usada para hacer una genoteca de cADN siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

La genoteca de cADN producida a partir de esta fuente fue usada para el análisis de secuencia de EST aleatorio como se ha descrito anteriormente en la publicación PCT N° WO97/23614 y en Simonet *et al.* (*Cell* **89**, 309-319 (1997)). Usando este método, fue detectado un cADN de ~2,1 kb que codificaba una nueva proteína TNFR-relacionada. El largo marco de lectura abierto del cADN de ODAR murino codifica una proteína de 625 restos de aminoácidos y contiene las propiedades contradictorias de proteínas TNFR-relacionadas: un péptido en señal hidrófobo en sus extremos N, cuatro secuencias de repetición ricas en cisteína tándem, un dominio transmembrana hidrófobo, y un dominio de señalización citoplásmico. La homología de esta proteína con otros miembros de la familia del receptor de TNF y su expresión en las células de médula ósea que se unen a la proteína de unión a OPG FITC-marcada sugiere que es un receptor potencial para la proteína de unión a OPG TNF-relacionada. Esta proteína se denomina ODAR, o receptor de diferenciación y activación de osteoclastos. Se muestra la secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de aminoácidos predicha de ODAR murino en las Figuras 10A-F.

El análisis reciente de secuencias en bases de datos públicamente disponibles indica que esta proteína es el homólogo murino de una proteína TNFR-relacionada humana conocida como RANK (Anderson *et al.*, *Nature* **390**, 175-179 (1997)).

Ejemplo 13

Producción de la proteína de ODAR recombinante en células de mamífero

Un dominio extracelular de ODAR soluble fusionado a la región Fc de IgG1 humano fue producido usando procedimientos para la construcción y la expresión de proteínas de fusión Fc como se ha descrito previamente en el documento WO97/23614 y en Simonet *et al.*, *supra*. Para generar la proteína de ODAR soluble en células de mamífero, el cADN que codifica el dominio extracelular de ODAR murino (aminoácidos 27-211) fue amplificado por PCR con el grupo siguiente de cebadores de oligonucleotido:

5' TCT CCA AGC TTG TGA CTC TCC AGG TCA CTC C-3'

(SEQ ID NO:37)

5' TCT CCG CGG CCG CGT AAG CCT GGG CCT CAT TGG GTG-3'

(SEQ ID NO:38)

Las reacciones PCR fueron llevadas a un volumen de 50 µl con 1 unidad de polimerasa de ADN Vent (Nueva Inglaterra, Biolabs) en Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, 0,1% de Triton-X100, 10 µM de cada dNTP, 1 µM de cada cebador y 10 ng de plantilla de cADN de ODAR. Las reacciones fueron realizadas a 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 1 minuto, para un total de 16 ciclos. El fragmento de la PCR fue aislado por electroforesis. El fragmento de la PCR crea un sitio de restricción Hind III en el extremo 5' y un sitio de restricción Not I en el extremo 3'. El fragmento digerido de la PCR Hind III-Not I entonces fue subclonado en marco en un vector pCEP4-Fc modificado delante de la secuencia de cadena pesada de IgG-γ1 humana como se ha descrito anteriormente en el documento WO97/23614 y en Simonet. *supra*). Un enlazador fue introducido que codifica dos aminoácidos no pertinentes que atraviesan la unión entre el dominio extracelular ODAR y la región IgG Fc.

La construcción entonces fue digerida con Nhe I y Hind III y el par de oligonucleotido hibridado siguiente que codifica el péptido señal de OPG (aminoácidos 1-21) fue insertado en marco:

5'CTA GCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GCG CAC TCC TGG
TGC TCC TGG ACA TCA TTG AAT GGA CAA CCC AGA-3' (SEQ ID
NO: 39)

5'AGC TTC TGG GTT GTC CAT TCA ATG ATG TCC AGG AGC ACC
AGG AGT GCG CAG CAC AGC CAC TTG TTC ATG GTG-3' (SEQ ID
NO: 40)

Un enlazador que codificaba dos aminoácidos no pertinentes fue introducido entre el péptido señal de OPG y las secuencias de ODAR. La construcción final modificada genéticamente (ODAR-Fc/pCEP4) codifica una proteína de fusión que contiene del extremo amino al término carboxi: péptido señal de OPG (aminoácidos 1-21)-enlazador (LysLeu)-ODAR (aminoácidos 27-211)-enlazador (AlaAla)-IgG Fc humano.

La construcción fue transfectada en células 293-EBNA-1 por el método del fosfato de calcio como se describe (Aubel *et al.*, *Curr. Prot. Mol. Biol.* 1, 9.1.1-9.1.3, (1994). Las células transfectadas entonces fueron seleccionadas en 200 µg/ml de higromicina (GibcoBRL) y los cultivos de masa resistentes al fármaco resultantes fueron reunidos y cultivados hasta confluencia. Las células fueron lavadas en PBS una vez y luego fueron cultivadas en medio sin suero durante 72 h. El medio acondicionado fue recogido. La proteína de fusión ODAR-Fc en el medio fue detectada por análisis de transferencia Western con anticuerpo de IgG Fc antihumano.

La proteína de fusión Fc fue purificada por cromatografía de columna de proteína-A (Perforan) usando los procedimientos recomendados por el fabricante. Cincuenta pmoles de la proteína purificada entonces fueron sometidos a análisis de la secuencia del extremo N-terminal por degradación Edman automatizada como se describe esencialmente en Matsudaira *et al.* (*J. Biol. Chem.* 262, 10-35 (1987)). La secuencia de aminoácidos siguiente fue leída después de 10 ciclos:

NH₂- K L V T L Q V T P-CO₂H.

La actividad de unión de ODAR-Fc con la proteína de unión a OPG fue examinada por tinción inmunofluorescente de cultivos celulares de COS 7 transfectados como se describe en el Ejemplo 2. Las células COS-7 fueron lipofectadas con 1 µg de un vector de expresión que contenía el ADN que codificaba la proteína de unión a OPG murina. Después de 48 h de incubación, las células entonces fueron incubadas en solución PBS-FBS que contenía 10 mg/µl de IgG Fc humano, ODAR-Fc, o proteína OPG-Fc a 4°C durante 1 h. Las células entonces fueron lavadas con PBS dos veces y luego fueron incubadas en solución de PBS-FBS que contenía 20 µg/ml de IgG antihumano de cabra FITC-marcado (Southern Biotech Associates) durante otra hora. Después del lavado con PBS, las células fueron examinadas por microscopía confocal (ACAS, Ultima, Insight Biomedical Imaging, Inc., Okemos, MI). Tanto ODAR-Fc como OPG-Fc se unen a células COS-7 OPGL transfectadas (Figuras 11A-C).

Ejemplo 14

Actividad biológica *in vitro* de ODAR soluble recombinante

La capacidad de ODAR para inhibir la estimulación de la formación de osteoclastos por la proteína de unión a OPG fue evaluada en un cultivo de médula ósea de ratón en presencia de CSF-1 (30 ng/ml) y la proteína de unión a OPG (5 ng/ml). Los procedimientos para el uso de cultivos de médula ósea de ratón para estudiar la maduración de osteoclastos se describen en el documento WO97/23614 y en el Ejemplo 8. La proteína de fusión ODAR-Fc producida como se describe en el Ejemplo 12 fue añadida a concentraciones de 65 a 1500 ng/ml. La formación de osteoclastos fue evaluada por citotóxica de fosfatasa alcalina resistente a tartrato (TRAP) y el ensayo de solución de TRAP después de cinco días en cultivo.

Una inhibición dependiente de la dosis de la formación de osteoclastos por la fusión ODAR-Fc fue observada tanto por citotóxica como por la actividad de TRAP (Figuras 12A-H). La proteína de fusión ODAR-Fc inhibió la formación de osteoclastos con un ED₅₀ de aproximadamente 10-50 ng/ml.

Ejemplo 15

Actividad biológica de ODAR recombinante soluble *in vivo*

Ratones macho BDF1 jóvenes de crecimiento rápido de 3-4 semanas de edad recibieron dosis variables de la proteína de fusión ODAR-Fc por una sola inyección diaria subcutánea en un vehículo (PBS/BSA del 0,1%) durante cuatro días. Los ratones fueron sometidos a rayos x el día 5. Las dosis de la proteína de fusión ODAR-Fc usadas fueron 0,5, 1,5 y 5 mg/kg/día. Para cada tratamiento, todos los ratones en aquel grupo y en el grupo de control que recibió PBS/BSA 0,1% fueron sometidos a rayos x en una película sola. La región metafisaria tibial proximal fue comparada entre pares de tibias control y tratadas y fue anotado como un "+" si la tibia tratada era más densa según

evaluación visual que el control proporcionando los 8 valores mostrados más abajo. Se requirió un valor aleatorio de 5/8 para un resultado "positivo". (La dosis estaba en mg/Kg/día). (n = 4).

5 Después del sacrificio, fue retirada la tibia derecha de cada animal y fue medida la densidad ósea en la metafisis tibial proximal por tomografía periférica cuantitativa automatizada (pQCT) (Stratec, Alemania). Dos cortes transversales de 0,5 mm de hueso, 1,5 mm y 2,0 mm a partir del extremo proximal de la tibia fueron analizados (XMICE 5.2, Stratec, Alemania) para determinar la densidad del mineral óseo total en la metafisis. Un umbral de separación de tejido blando de 1500 fue usado para definir el límite del hueso metafisario.

10 La administración de ODAR-Fc en ratones jóvenes en crecimiento inhibió la resorción ósea en la placa de crecimiento tibial proximal produciendo una región de mayor densidad ósea que la evidente visualmente en las radiografías. Los cambios radiográficos fueron evidentes en una dosis de 1,5 mg/kg/día y superiores en dos experimentos (Tabla 1). La medida de la densidad ósea por pQCT en las muestras del segundo experimento en una región similar de la tibia confirmó el aumento dependiente de la dosis en la densidad ósea en estos ratones (Figura 13).

Tabla 1

Inhibición de resorción ósea por la proteína de fusión ODAR-Fc

15 **Experimento N° 1**

Factor	Dosis	1	2	3	4	5	6	7	8	Resultado
ODAR- Fc	5,0	+	+	+	+	+	+	+	+	Positivo 8/8
ODAR-Fc	1,5	-	+	+	-	+	+	+	+	Positivo 6/8
ODAR-Fc	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo 0/8
ODAR-Fc	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo 0/8

Experimento N° 2

Factor	Dosis	1	2	3	4	5	6	7	8	Resultado
Factor	Dosis	1	2	3	4	5	6	7	8	Resultado
ODAR- Fc	5,0	+	+	+	+	+	+	+	+	Positivo 8/8
ODAR-Fc	1,5	+	+	+	+	+	+	+	+	Positivo 8/8
ODAR-Fc	0,5	-	-	-	+	-	-	-	-	Negativo 1/8

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Amgen Inc.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PROTEINAS DE UNIÓN DE OSTEOPROTEGERINA

5 Y RECEPTORES

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 40

(iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: Amgen Inc.

(B) CALLE: One Amgen Center Drive

10 (C) CIUDAD: Thousand Oaks

(D) ESTADO: California

(B) PAÍS: EE.UU.

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 91320-1789

(v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

15 (A) TIPO DE MEDIO: disquete

(B) ORDENADOR: PC IBM compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

20 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Winter, Robert B.

25 (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: A-451B

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2295 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICAS:

35 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 158..1105

ES 2 284 203 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

GAGCTCGGAT CCACTACTCG ACCCACGCGT CCGGCCAGGA CCTCTGTGAA CCGGTCGGGG	60
CGGGGGCCGC CTGGCCGGGA GTCTGCTCGG CCGTGGGTGG CCGAGGAAGG GAGAGAACGA	120
TCGCGGAGCA GGGCGCCCGA ACTCCGGGCG CCGCGCC ATG CGC CGG GCC AGC CGA	175
	Met Arg Arg Ala Ser Arg
	1 5
GAC TAC GGC AAG TAC CTG CGC AGC TCG GAG GAG ATG GGC AGC GGC CCC	223
Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro	

ES 2 284 203 T5

10				15				20								
GGC	GTC	CCA	CAC	GAG	GGT	CCG	CTG	CAC	CCC	GCG	CCT	TCT	GCA	CCG	GCT	271
Gly	Val	Pro	His	Glu	Gly	Pro	Leu	His	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	
		25					30					35				
CCG	GCG	CCG	CCA	CCC	GCC	GCC	TCC	CGC	TCC	ATG	TTC	CTG	GCC	CTC	CTG	319
Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Met	Phe	Leu	Ala	Leu	Leu	
	40					45					50					
GGG	CTG	GGA	CTG	GGC	CAG	GTG	GTC	TGC	AGC	ATC	GCT	CTG	TTC	CTG	TAC	367
Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Cys	Ser	Ile	Ala	Leu	Phe	Leu	Tyr	
	55				60					65					70	
TTT	CGA	GCG	CAG	ATG	GAT	CCT	AAC	AGA	ATA	TCA	GAA	GAC	AGC	ACT	CAC	415
Phe	Arg	Ala	Gln	Met	Asp	Pro	Asn	Arg	Ile	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr	His	
				75					80					85		
TGC	TTT	TAT	AGA	ATC	CTG	AGA	CTC	CAT	GAA	AAC	GCA	GGT	TTG	CAG	GAC	463
Cys	Phe	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Glu	Asn	Ala	Gly	Leu	Gln	Asp	
			90					95					100			
TCG	ACT	CTG	GAG	AGT	GAA	GAC	ACA	CTA	CCT	GAC	TCC	TGC	AGG	AGG	ATG	511
Ser	Thr	Leu	Glu	Ser	Glu	Asp	Thr	Leu	Pro	Asp	Ser	Cys	Arg	Arg	Met	
	105						110					115				
AAA	CAA	GCC	TTT	CAG	GGG	GCC	GTG	CAG	AAG	GAA	CTG	CAA	CAC	ATT	GTG	559
Lys	Gln	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Val	Gln	Lys	Glu	Leu	Gln	His	Ile	Val	
	120					125					130					
GGG	CCA	CAG	CGC	TTC	TCA	GGA	GCT	CCA	GCT	ATG	ATG	GAA	GGC	TCA	TGG	607
Gly	Pro	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Ala	Pro	Ala	Met	Met	Glu	Gly	Ser	Trp	
	135				140					145					150	
TTG	GAT	GTG	GCC	CAG	CGA	GGC	AAG	CCT	GAG	GCC	CAG	CCA	TTT	GCA	CAC	655
Leu	Asp	Val	Ala	Gln	Arg	Gly	Lys	Pro	Glu	Ala	Gln	Pro	Phe	Ala	His	
				155					160					165		
CTC	ACC	ATC	AAT	GCT	GCC	AGC	ATC	CCA	TCG	GGT	TCC	CAT	AAA	GTC	ACT	703
Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Ile	Pro	Ser	Gly	Ser	His	Lys	Val	Thr	
			170					175					180			
CTG	TCC	TCT	TGG	TAC	CAC	GAT	CGA	GGC	TGG	GCC	AAG	ATC	TCT	AAC	ATG	751
Leu	Ser	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Arg	Gly	Trp	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Met	
		185					190					195				
ACG	TTA	AGC	AAC	GGA	AAA	CTA	AGG	GTT	AAC	CAA	GAT	GGC	TTC	TAT	TAC	799
Thr	Leu	Ser	Asn	Gly	Lys	Leu	Arg	Val	Asn	Gln	Asp	Gly	Phe	Tyr	Tyr	
	200					205					210					
CTG	TAC	GCC	AAC	ATT	TGC	TTT	CGG	CAT	CAT	GAA	ACA	TCG	GGA	AGC	GTA	847
Leu	Tyr	Ala	Asn	Ile	Cys	Phe	Arg	His	His	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Val	
	215				220					225					230	
CCT	ACA	GAC	TAT	CTT	CAG	CTG	ATG	GTG	TAT	GTC	GTT	AAA	ACC	AGC	ATC	895
Pro	Thr	Asp	Tyr	Leu	Gln	Leu	Met	Val	Tyr	Val	Val	Lys	Thr	Ser	Ile	
				235					240					245		
AAA	ATC	CCA	AGT	TCT	CAT	AAC	CTG	ATG	AAA	GGA	GGG	AGC	ACG	AAA	AAC	943
Lys	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Asn	Leu	Met	Lys	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Asn	
			250				255						260			
TGG	TCG	GGC	AAT	TCT	GAA	TTC	CAC	TTT	TAT	TCC	ATA	AAT	GTT	GGG	GGA	991
Trp	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Phe	His	Phe	Tyr	Ser	Ile	Asn	Val	Gly	Gly	

ES 2 284 203 T5

265	270	275	
TTT TTC AAG CTC CGA GCT GGT GAA GAA ATT AGC ATT CAG GTG TCC AAC Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn 280 285 290			1039
CCT TCC CTG CTG GAT CCG GAT CAA GAT GCG ACG TAC TTT GGG GCT TTC Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe 295 300 305 310			1087
AAA GTT CAG GAC ATA GAC TGAGACTCAT TTCGTGGAAC ATTAGCATGG Lys Val Gln Asp Ile Asp 315			1135
ATGTCCTAGA TGTMTGGAAA CTTCTTAAAA AATGGATGAT GTCTATACAT GTGTAAGACT			1195
ACTAAGAGAC ATGGCCCACG GTGTATGAAA CTCACAGCCC TCTCTCTTGA GCCTGTACAG			1255
GTTGTGTATA TGTAAGTCC ATAGGTGATG TTAGATTCAT GGTGATTACA CAACGGTTTT			1315
ACAATTTTGT AATGATTTCC TAGAATTGAA CCAGATTGGG AGAGGTATTC CGATGCTTAT			1375
GAAAACTTA CACGTGAGCT ATGGAAGGGG GTCACAGTCT CTGGGTCTAA CCCCTGGACA			1435
TGTGCCACTG AGAACCTTGA AATTAAGAGG ATGCCATGTC ATTGCAAAGA AATGATAGTG			1495
TGAAGGGTTA AGTTCTTTTG AATTGTTACA TTGCGCTGGG ACCTGCAAAT AAGTTCTTTT			1555
TTTCTAATGA GGAGAGAAAA ATATATGTAT TTTTATATAA TGTCTAAAGT TATATTTTCTAG			1615
GTGTAATGTT TTCTGTGCAA AGTTTTGTAA ATTATATTTG TGCTATAGTA TTTGATTTCAA			1675
AATATTTTAAA AATGTCTCAC TGTTGACATA TTTAATGTTT TAAATGTACA GATGTATTTA			1735
ACTGGTGCAC TTTGTAATTC CCCTGAAGGT ACTCGTAGCT AAGGGGGCAG AATACTGTTT			1795
CTGGTGACCA CATGTAGTTT ATTTCTTTAT TCTTTTTAAC TTAATAGAGT CTTCAGACTT			1855
GTCAAACTA TGCAAGCAAA ATAAATAAAT AAAAATAAAA TGAATACCTT GAATAATAAG			1915
TAGGATGTTG GTCACCAGGT GCCTTTCAAA TTTAGAAGCT AATFGACTTT AGGAGCTGAC			1975
ATAGCCAAAA AGGATACATA ATAGGCTACT GAAATCTGTC AGGAGTATTT ATGCAATTAT			2035
TGAACAGGTG TCTTTTTTTA CAAGAGCTAC AAATTGTAAA TTTTGTCTTCT TTTTTTTCCC			2095
ATAGAAAATG TACTATAGTT TATCAGCCAA AAAACAATCC ACTTTTTAAT TTAGTGAAAG			2155
TTATTTTATT AACTGTACA ATAAAAGCAT TGTCTCTGAA TGTTAATTTT TTGGTACAAA			2215
AAATAAATTT GTACGAAAAC CTGAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGG GCGGCCGCTC			2275
TAGAGGGCCC TATTCTATAG			2295

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 315 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

ES 2 284 203 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser
 35 40 45
 Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser
 50 55 60
 Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu
 85 90 95
 Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro
 100 105 110
 Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys
 115 120 125
 Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala
 130 135 140
 Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu
 145 150 155 160
 Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser
 165 170 175
 Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp
 180 185 190
 Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn
 195 200 205
 Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His
 210 215 220
 Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr
 225 230 235 240
 Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys
 245 250 255
 Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr
 260 265 270
 Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala
 290 295 300
 Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
 305 310 315

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2274 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 185..1135

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTACT CGACCCACGC GTCCGCGCGC CCCAGGAGCC	60
AAAGCCGGGC TCCAAGTCGG CGCCCCACGT CGAGGCTCCG CCGCAGCCTC CGGAGTTGGC	120
CGCAGACAAG AAGGGGAGGG AGCGGGAGAG GGAGGAGAGC TCCGAAGCGA GAGGGCCGAG	180
CGCC ATG CGC CGC GCC AGC AGA GAC TAC ACC AAG TAC CTG CGT GGC TCG	229
Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser	
1 5 10 15	
GAG GAG ATG GGC GGC GGC CCC GGA GCC CCG CAC GAG GGC CCC CTG CAC	277
Glu Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His	
20 25 30	
GCC CCG CCG CCG CCT GCG CCG CAC CAG CCC CCC GCC GCC TCC CGC TCC	325
Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser	
35 40 45	
ATG TTC GTG GCC CTC CTG GGG CTG GGG CTG GGC CAG GTT GTC TGC AGC	373
Met Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser	
50 55 60	
GTC GCC CTG TTC TTC TAT TTC AGA GCG CAG ATG GAT CCT AAT AGA ATA	421
Val Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile	
65 70 75	
TCA GAA GAT GGC ACT CAC TGC ATT TAT AGA ATT TTG AGA CTC CAT GAA	469
Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu	
80 85 90 95	
AAT GCA GAT TTT CAA GAC ACA ACT CTG GAG AGT CAA GAT ACA AAA TTA	517
Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu	
100 105 110	
ATA CCT GAT TCA TGT AGG AGA ATT AAA CAG GCC TTT CAA GGA GCT GTG	565
Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val	
115 120 125	
CAA AAG GAA TTA CAA CAT ATC GTT GGA TCA CAG CAC ATC AGA GCA GAG	613
Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu	
130 135 140	
AAA GCG ATG GTG GAT GGC TCA TGG TTA GAT CTG GCC AAG AGG AGC AAG	661
Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys	
145 150 155	
CTT GAA GCT CAG CCT TTT GCT CAT CTC ACT ATT AAT GCC ACC GAC ATC	709
Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile	

ES 2 284 203 T5

160					165					170					175	
CCA	TCT	GGT	TCC	CAT	AAA	GTG	AGT	CTG	TCC	TCT	TGG	TAC	CAT	GAT	CGG	757
Pro	Ser	Gly	Ser	His	Lys	Val	Ser	Leu	Ser	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Arg	
				180					185					190		
GGT	TGG	GCC	AAG	ATC	TCC	AAC	ATG	ACT	TTT	AGC	AAT	GGA	AAA	CTA	ATA	805
Gly	Trp	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Met	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	
			195					200					205			
GTT	AAT	CAG	GAT	GGC	TTT	TAT	TAC	CTG	TAT	GCC	AAC	ATT	TGC	TTT	CGA	853
Val	Asn	Gln	Asp	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ile	Cys	Phe	Arg	
		210					215					220				
CAT	CAT	GAA	ACT	TCA	GGA	GAC	CTA	GCT	ACA	GAG	TAT	CTT	CAA	CTA	ATG	901
His	His	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	Leu	Ala	Thr	Glu	Tyr	Leu	Gln	Leu	Met	
	225					230					235					
GTG	TAC	GTC	ACT	AAA	ACC	AGC	ATC	AAA	ATC	CCA	AGT	TCT	CAT	ACC	CTG	949
Val	Tyr	Val	Thr	Lys	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Thr	Leu	
240					245					250					255	
ATG	AAA	GGA	GGA	AGC	ACC	AAG	TAT	TGG	TCA	GGG	AAT	TCT	GAA	TTC	CAT	997
Met	Lys	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Trp	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Phe	His	
				260					265					270		
TTT	TAT	TCC	ATA	AAC	GTT	GGT	GGA	TTT	TTT	AAG	TTA	CGG	TCT	GGA	GAG	1045
Phe	Tyr	Ser	Ile	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Glu	
			275					280						285		
GAA	ATC	AGC	ATC	GAG	GTC	TCC	AAC	CCC	TCC	TTA	CTG	GAT	CCG	GAT	CAG	1093
Glu	Ile	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	
		290					295						300			
GAT	GCA	ACA	TAC	TTT	GGG	GCT	TTT	AAA	GTT	CGA	GAT	ATA	GAT			1135
Asp	Ala	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Val	Arg	Asp	Ile	Asp			
	305					310					315					
TGAGCCCCAG	TTTTTGGAGT	GTTATGTATT	TCCTGGATGT	TTGGAAACAT	TTTTTAAAAC											1195
AAGCCAAGAA	AGATGTATAT	AGGTGTGTGA	GACTACTAAG	AGGCATGGCC	CCAACGGTAC											1255
ACGACTCAGT	ATCCATGCTC	TTGACCTTGT	AGAGAACACG	CGTATTTACA	GCCAGTGGGA											1315
GATGTTAGAC	TCATGGTGTG	TTACACAATG	GTTTTTAAAT	TTTGTAATGA	ATTCCTAGAA											1375
TTAAACCAGA	TTGGAGCAAT	TACGGGTTGA	CCTTATGAGA	AACTGCATGT	GGGCTATGGG											1435
AGGGGTTGGT	CCCTGGTCAT	GTGCCCCTTC	GCAGCTGAAG	TGGAGAGGGT	GTCATCTAGC											1495
GCAATTGAAG	GATCATCTGA	AGGGGCAAAT	TCTTTTGAAT	TGTTACATCA	TGCTGGAACC											1555
TGCAAAAAAT	ACTTTTTCTA	ATGAGGAGAG	AAAATATATG	TATTTTTATA	TAATATCTAA											1615
AGTTATATTT	CAGATGTAAT	GTTTTCTTTG	CAAAGTATTG	TAAATTATAT	TTGTGCTATA											1675
GTATTTGATT	CAAAATATTT	AAAAATGTCT	TGCTGTTGAC	ATATTTAATG	TTTTAAATGT											1735
ACAGACATAT	TAACTGGTG	CACTTTGTAA	ATTCCTGGG	GAAAACCTGC	AGCTAAGGAG											1795
GGGAAAAAAA	TGTTGTTTCC	TAATATCAAA	TGCAGTATAT	TTCTTCGTTTC	TTTTTAAGTT											1855
AATAGATTTT	TTCAGACTTG	TCAAGCCTGT	GCAAAAAAAT	TAAAATGGAT	GCCTTGAATA											1915

ES 2 284 203 T5

ATAAGCAGGA TGTTGGCCAC CAGGTGCCTT TCAAATTTAG AAAC TAATTG ACTTTAGAAA 1975
 GCTGACATTG CCAAAAAGGA TACATAATGG GCCACTGAAA TCTGTCAAGA GTAGTTATAT 2035
 AATTGTTGAA CAGGTGTTTT TCCACAAGTG CCGCAAATTG TACCTTTTTT TTTTTTTCAA 2095
 AATAGAAAAG TTATTAGTGG TTTATCAGCA AAAAAGTCCA ATTTTAATTT AGTAAATGTT 2155
 ATCTTATACT GTACAATAAA AACATTGCCT TTGAATGTTA ATTTTTTGGT ACAAAAATAA 2215
 ATTTATATGA AAAAAAAAAA AAAAGGGCGG CCGCTCTAGA GGGCCCTATT CTATAGGCT 2274

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 317 aminoacidos
- (B) TIPO: aminoacido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

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

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

ATTTGATTCT AGAAGGAGGA ATAACATATG CATGAAAACG CAGGTCTGCA G

51

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

TATCCGCGGA TCCTCGAGTT AGTCTATGTC CTGAACTTTG AA

42

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 54 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

ATTTGATTCT AGAAGGAGGA ATAACATATG TCTGAAGACA CTCTGCCGGA CTCC

54

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

TATCCGCGGA TCCTCGAGTT AGTCTATGTC CTGAACTTTG AA 42

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

ATTTGATTCT AGAAGGAGGA ATAACATATG AAACAAGCTT TTCAGGGG 48

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

25 TATCCGCGGA TCCTCGAGTT AGTCTATGTC CTGAACTTTG AA 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

ATTTGATTCT AGAAGGAGGA ATAACATATG AAAGAAGTGC AGCACATTGT G 51

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

TATCCGCGGA TCCTCGAGTT AGTCTATGTC CTGAACTTTG AA

42

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 51 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

5 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

ATTTGATTCT AGAAGGAGGA ATAACATATG CAGCGTTTCT CTGGTGCTCC A 51

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

20 TATCCGCGGA TCCTCGAGTT AGTCTATGTC CTGAACTTTG AA 42

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

25 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

GTTCTCCTCA TATGGAAGGT TCTTGGTTGG ATGTGGCCCA 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

TACGCACTCC GCGGTTAGTC TATGTCCTGA ACTTTGA

37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

GTTCTCCTCA TATGCGTGGT AAACCTGAAG CTCAACCATT TGCA

44

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 20:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

TACGCACTCC GCGGTTAGTC TATGTCCTGA ACTTTGA

37

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 53 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

GTTCTCCTCA TATGAAACCT GAAGCTCAAC CATTTGCACA CCTCACCATC AAT 53

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

TACGCACTCC GCGGTTAGTC TATGTCCTGA ACTTTGA 37

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 65 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

GTTCTCCTCA TATGCATTTA ACTATTAACG CTGCATCTAT CCCATCGGGT TCCCATAAAG 60

25 TCACT

65

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

TACGCACTCC GCGGTTAGTC TATGTCCTGA ACTTTGA

37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 59 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CATENARIEDAD: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

GTTCTCCTCA TATGACTATT AACGCTGCAT CTATCCCATC GGGTCCCAT AAAGTCACT

59

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 37 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CATENARIEDAD: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

TACGCACTCC GCGGTTAGTC TATGTCCTGA ACTTTGA

37

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 30 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CATENARIEDAD: sencilla
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

CCTCTAGGCC TGTACTTTTCG AGCGCAGATG

30

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

5 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

CCTCTGCGGC CGCGTCTATG TCCTGAACTT TG 32

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

20 CCTCTCTCGA GTGGACAACC CAGAAGCCTG AGGCCAGCC ATTTCG 46

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

25 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

CCTCTGCGGC CGCGTCTATG TCCTGAACTT TG 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 56 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

AGCTTCCACC ATGAACAAGT GGCTGTGCTG CGCACTCCTG GTGCTCCTGG ACATCA 56

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 56 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

TGCATGATGT CCAGGAGCAC CAGGAGTGCG CAGCACAGCC ACTTGTTTCAT GGTGGA 56

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 33:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido.

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser
1 5 10 15

Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser
20 25

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Cys
 20 25

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoacidos

(B) TIPO: aminoacido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu
 1 5 10 15
 Met

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

TCTCCAAGCT TGTGACTCTC CAGGTCCTC C

31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 37:

5 TCTCCGCGGC CGCGTAAGCC TGGGCCTCAT TGGGTG 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 38:

CTAGCACCAT GAACAAAGTGG CTGTGCTGCG CACTCCTGGT GCTCCTGGAC ATCATTTGAAT 60

GGACAACCCA GA 72

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 72 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 39:

AGCTTCTGGG TTGTCCATTC AATGATGTCC AGGAGCACCA GGAGTGC GCA GCACAGCCAC 60

TTGTTTCATGG TG 72

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 40:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 40:

Lys Leu Val Thr Leu Gln Val Thr Pro
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un anticuerpo como modulador de la proteína de unión a osteoprotegerina (OPGbp) para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad ósea, en donde el anticuerpo es un antagonista que se une al OPGbp de las Figuras 4 A-F (SEQ ID NO: 4) e inhibe osteoclastogénesis y/o resorción ósea mediadas por OPGbp.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
4. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo injertado en las CDR.
- 10 5. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
6. El uso de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo se prepara por la inmunización de un animal transgénico capaz de producir anticuerpos humanos.
7. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a una forma asociada a la membrana de OPGbp.
- 15 8. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a una forma soluble de OPGbp.
9. El uso de la reivindicación 8, en donde la forma soluble de OPGbp comprende los restos de aminoácidos 69-317 de las Figuras 4 A-F (SEQ ID NO: 4).
- 20 10. El uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se administra con uno o más de un factor morfogénico óseo seleccionado de BMP-1 a BMP-12, factor- β de crecimiento transformante, un miembro de la familia del factor- β de crecimiento transformante, un factor de crecimiento de fibroblasto seleccionado de FGF-1 a FGF-10, un inhibidor de interleuquina-1, un inhibidor de TNF- α , hormona paratiroidea, una prostaglandina de la serie E, un bisfosfonato, o un mineral de potenciación ósea.

```

GAGCTCGGAT CCACTACTCG ACCCACGGGT CCGGCCAGGA CCTCTGTGAA CCGGTCGGGG 60
CGGGGGCCGC CTGGCCGGGA GTCGTGCTCGG CCGTGGGTGG CCGAGGAAGG GAGAGAACGA 120
TCGGGGAGCA GGGCGCCCGA ACTCCGGGCG CCGCGCC ATG CGC CGG GCC AGC CGA 175
Met Arg Arg Ala Ser Arg
1 5
GAC TAC GGC AAG TAC CTG CGC AGC TCG GAG GAG ATG GGC AGC GGC CCC 223
Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro
10 15 20
GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC CCC GCG CCT TCT GCA CCG GCT 271
Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
25 30 35
CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG TTC CTG GCC CTC CTG 319
Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu
40 45 50

```

FIG.1A

GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC AGC ATC GCT CTG TTC CTG TAC	367		
Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr	70		
55	60	65	70
TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA ATA TCA GAA GAC AGC ACT CAC	415		
Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His	85		
75	80	85	
TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT GAA AAC GCA GGT TTG CAG GAC	463		
Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp	100		
90	95	100	
TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC AGG AGG ATG	511		
Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met	115		
105	110	115	
AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG AAG GAA CTG CAA CAC ATT GTG	559		
Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val	130		
120	125	130	

FIG.1B

GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA GCT ATG GAA GGC TCA TGG	607
Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Met Met Glu Gly Ser Trp	
135	145
TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT GAG GCC CAG CCA TTT GCA CAC	655
Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His	
155	160
CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC ACT	703
Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr	
170	175
CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC TGG GCC AAG ATC TCT AAC ATG	751
Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser <u>Asn</u> Met	
185	190
	195

FIG.1C

799
 ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT AAC CAA GAT GGC TTC TAT TAC
 Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr
 200 205 210 799

 847
 CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT CAT GAA ACA TCG GGA AGC GTA
 Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val
 215 220 225 230 847

 895
 CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG TAT GTC GTT AAA ACC AGC ATC
 Pro Thr Asp Tyr Leu Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile
 235 240 245 895

 943
 AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG AAA AAC
 Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn
 250 255 260 943

 991
 TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT TAT TCC ATA AAT GTT GGG GGA
 Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
 265 270 275 991

FIG.1D

TTT	TTC	AAG	CTC	CGA	GCT	GGT	GAA	GAA	ATT	AGC	ATT	CAG	GTG	TCC	AAC	1039
Phe	Phe	Lys	Leu	Arg	Ala	GLY	Glu	Glu	Ile	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	<u>Asn</u>	
280						285			290							
CCT	TCC	CTG	CTG	GAT	CCG	GAT	CAA	GAT	GCG	ACG	TAC	TTT	GGG	GCT	TTC	1087
Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	Asp	Ala	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	
295					300					305					310	
AAA	GTT	CAG	GAC	ATA	GAC	T	GAGACTCATT	TCGTGGAACA	TTAGCATGGA							1136
Lys	Val	Gln	Asp	Ile	Asp											
						315										
TGTCCTAGAT	GTTTGGAAAC	TTCTTAAAAA	ATGGATGATG	TCTATACATG	TGTAAGACTA											1196
CTAAGAGACA	TGGCCACCG	TGTATGAAAC	TCACAGCCCT	CTCTCTTGAG	CCTGTACAGG											1256
TTGTGTATAT	GTAAGTCCA	TAGGTGATGT	TAGATTTCATG	GTGATTACAC	AACGGTTTTA											1316

FIG.1E

CAATTTGTA ATGATTTCCCT AGAATTGAAC CAGATTGGGA GAGGTATTCC GATGCTTATG 1376
 AAAAACTTAC ACGTGAGCTA TGGAAGGGGG TCACAGTCTC TGGGTCTAAC CCCTGGACAT 1436
 GTGCCACTGA GAACCTTGAA ATTAAGAGGA TGCCATGTCA TTGCCAAAGAA ATGATAGTGT 1496
 GAAGGGTAA GTTCTTTTGA ATGTTACAT TGCCTGGGA CCTGCAATA AGTTCITTTT 1556
 TTCTAATGAG GAGAGAAAA TATAIGTATT TTTATATAAT GTCTAAAGTT ATATTTCAGG 1616
 TGTAATGTTT TCTGTGCAAA GTTTTGTAAA TTATATTTGT GCTATAGTAT TTGATTCAAA 1676
 ATATTTAAA ATGCTCACT GTTGACATAT TTAATGTTTT AAATGTACAG ATGTATTTAA 1736
 CTGGTGCACT TTGTAATTCC CCTGAAGGTA CTCGTAGCTA AGGGGCAGA ATACTGTTC 1796
 TGGTGACCAC ATGTAGTTTA TTTCTTTATT CTTTTTAACT TAATAGAGTC TTCAGACTTG 1856

FIG.1F

TCAAAACTAT GCAAGCAAAA TAAATAAATA AAAATAAAAT GAATACCTTG AATAATAAGT 1916
AGGATGTTGG TCACCAGGTG CCTTCAAAAT TTAGAAGCTA ATTGACTTTA GGAGCTGACA 1976
TAGCCAAAAA GGATACATAA TAGGCTACTG AAATCTGTCA GGAGTATTTA TGCAATTATT 2036
GAACAGGTGT CTTTTTTTAC AAGAGCTACA AATTGTAAAT TTTGTTTCTT TTTTTTCCCA 2096
TAGAAAATGT ACTATAGTTT ATCAGCCAAA AAACAATCCA CTTTTTAATT TAGTGAAAGT 2156
TATTTTATTA TACTGTACAA TAAAAGCATT GTCTCTGAAT GTTAATTTTT TGGTACAAAA 2216
AATAAATTG TACGAAAACC TGAIAAIAAIAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2276
AGAGGGCCCT ATTCTATAG 2295

FIG.1G

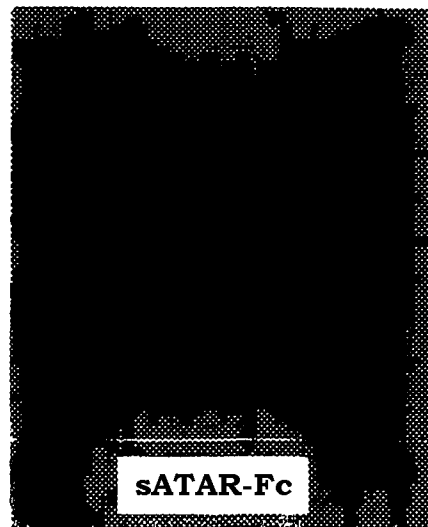
FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C



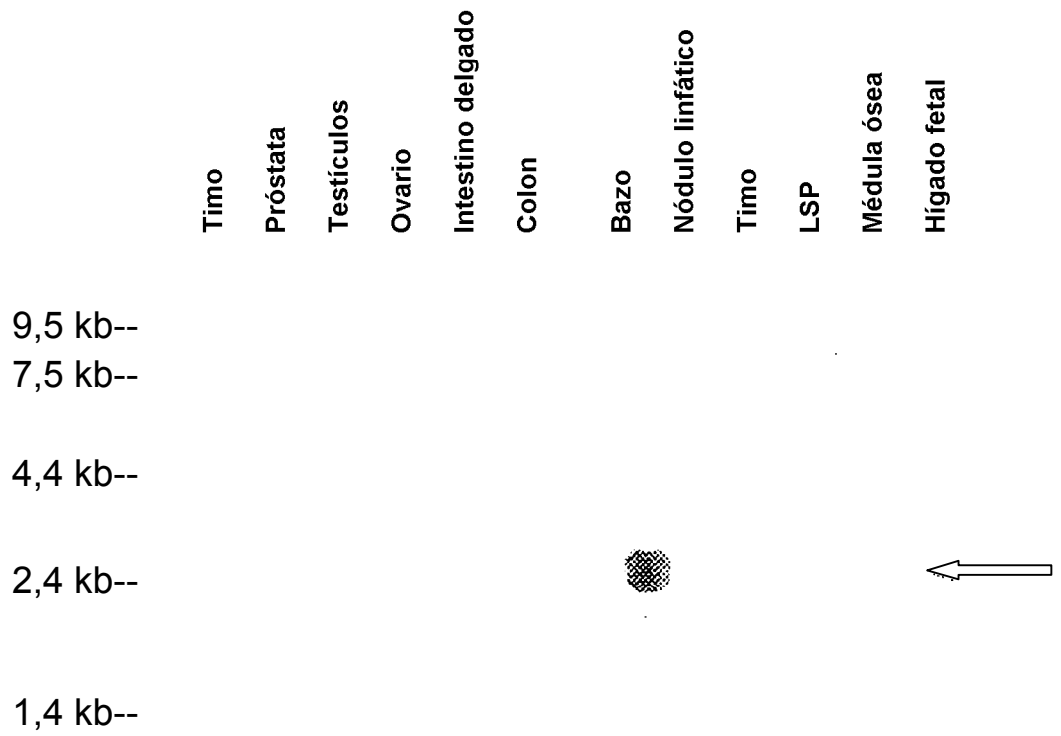


FIG. 3


```

10          30          50
AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTACTCGACCCACGGCTCCGGCGGCCCCAGGAGCC

70          90          110
AAAGCCGGCTCCAAGTCGGGCCCCACGTCGAGGCTCCGCCCGCAGCCTCCGGAGTTGGC

130         150         170
CGCAGACAAGAGGGAGGGAGCGGGAGAGGGAGAGCTCCGAAGCCAGAGGGCCGAG

190         210         230
CGCCATGCGCCGCGCCAGACAGACTACACC AAGTACCTGCGTGGCTCGGAGAGATGGG
M R R A S R D Y T K Y L R G S E E M G

250         270         290
CGGCGCCCGGAGCCCGCACGAGGGCCCTGCAAGCCCGCCCGCCTGCGGCCGCA
G G P G A P H E G P L H A P P P A P H

310         330         350
CCAGCCCGCCGCGCTCCCGTCCATGTTGCGTGCCCTCCTGGGGCTGGGGCTGGGCCA
Q P P A A S R S M F V A L L G L G L G Q

370         390         410
GGTTGTCTGCAGCGTCCCGCTGTTCTTCTATTTTCAGAGCCAGATGGATCCTAATAAGAT
V V C S V A L F F Y F R A Q M D P N R I

```

FIG.4A

430
 ATCAGAAGATGGCACTCACTGCATTTATAGAATTTTGAGACTCCCATGAAAATGCAGATTT
 S E D G T H C I Y R I L R L H E N A D F 470

 490
 TCAAGACAACTCTGGAGAGTCAAGATACAATAAATAACCTGATTCATGTAGGAGAAT
 Q D T T L E S Q D T K L I P D S C R R I 530

 550
 TAAACAGGCCTTCAAGGAGCTGTGCAAAAGGAATTACAACATATCGTTGGATCACAGCA
 K Q A F Q G A V Q K E L Q H I V G S Q H 590

 610
 CATCAGAGCAGAGAAGCGATGGTGGATGGCTCATGGTTAGATCTGGCCCAAGAGGAGCAA
 I R A E K A M V D G S W L D L A K R S K 650

 670
 GCTTGAAGCTCAGCCTTTTGCTCATCTCACTATAATGCCACCGACATCCCATCTGGTTC
 L E A Q P F A H L T I N A T D I P S G S 710

 730
 CCATAAAGTGAGTCTGTCCCTCTTGGTACCATGATCGGGGTTGGCCCAAGATCTCCAACAT
 H K V S L S S W Y H D R G W A K I S N M 770

FIG.4B

790	810	830
GACTTTTAGCAATGGAAATAA	TAATCAGGATGGCTTTTAT	TACCTGTATGCCAA
T F S N G K L I V N Q D G F Y Y L Y A N		
850	870	890
CATTGCTTTCGACATCATGAA	ACTTCAGGAGACC	TAGCTACAGAGTATCTTCAACTAAT
I C F R H H E T S G D L A T E Y L Q L M		
910	930	950
GGTGACGTCACTAAACCAG	CATCAAAATCCCAAGTTCTC	CATACCCCTGATGAAAGGAGG
V Y V T K T S I K I P S S H T L M K G G		
970	990	1010
AAGCACCAAGTATTGGTCAG	GGAATTCTGAATTCCCATTTT	TATCCATAAACCCTTGGTGG
S T K Y W S G N S E F H F Y S I N V G G		
1030	1050	1070
ATTTTTAAGTTACGGTCTG	GAGAGGAAATCAGCATCGAG	GGTCTCCAACCCCTTACT
F F K L R S G E E I S I E V S N P S L L		
1090	1110	1130
GGATCCGGATCAGGATGCA	ACATACTTTGGGCTTTTAA	AGTTCGAGATATAGATTGAGC
D P D Q D A T Y F G A F K V R D I D		

FIG.4C

```

1150          1170          1190
CCCAGTTTGGAGTGTATGTATTTCCCTGGATGTTGGAAACATTTTAAACAAGCC

1210          1230          1250
AAGAAAGATGATATAGGTGTGTGAGACTACTAAGAGGCATGGCCCCAACGGTACACGAC

1270          1290          1310
TCAGTATCCATGCTCTTGACCCTTGTAGAGAAACACGCCGTATTTACAGCCAGTGGAGATGT

1330          1350          1370
TAGACTCATGGTGTACACAAATGGTTTTTAAATTTTGTAAATGAATTCCTAGAAATAAA

1390          1410          1430
CCAGATTGGAGCAATTACGGGTTGACCCTTATGAGAAACTGCATGTGGGCTATGGAGGGG

```

FIG.4D

1450 1470 1490
TTGGTCCCTGGTCAATGTGCCCTTCGCAGCTGAAGTGGAGAGGGTGTCACTAGCGCAAT

1510 1530 1550
TGAAGGATCATCTGAAGGGCAAATTCCTTTTGAATTGTTACATCATGCTGGAACCTGCAA

1570 1590 1610
AAAATACCTTTTCTAATGAGGAGAGAAAATAATATGTATTTTATATAATCTAAAGTTA

1630 1650 1670
TATTTCAGATGTAATGTTTTCTTTGCAAGTATTGTAATTAATTTGTGCTATAGTATT

1690 1710 1730
TGATTCAAATAATTTAAAATGTCTTGCTGTGACATAATTTAAATGTACAGA

1750 1770 1790
CATATTTAACTGGTGCACTTTGTAAATTCCTGGGAAACTTGCAGCTAAGGAGGGAA

1810 1830 1850
AAAAATGTTGTTCCCTAATAATCAAAATGCAGTATATTCTTCGTTCTTTTAAAGTTAATAG

FIG.4E

```

1870          1890          1910
ATTTTTCAGACTTGTC AAGCCTGTG CAAA AAAA TTA AAATGGATGCCCTTGAATAA TAG

1930          1950          1970
CAGGATGTTGGCCACCAGG TGCCCTTTC A AAATTTAGAACTAATTGACTTTAGAAAGCTGA

1990          2010          2030
CATTGCCAAAAGGATACATAATGGGCCCACTGAAATCTGTCAAGAGTAGTTATAAATTG

2050          2070          2090
TTGAACAGGTGTTTTTCCACAAGTGCCGCAAAATTGTACCTTTTTTTTTTTTCAA AATAG

2110          2130          2150
AAAAGTTATTAGTGGTTTATCAGCAAAAAGTCCAATTTTAATTTAGTAAATGTTATCTT

2170          2190          2210
ATACTGTACAATAAAAACATTTGCCCTTTGAAATGTTAATTTTTGGTACAAAATAAATTTA

2230          2250          2270
TATGAAA AAAA AAAA AAGGGCCGCTCTAGAGGGCCCTATTCTATAG

```

FIG.4F

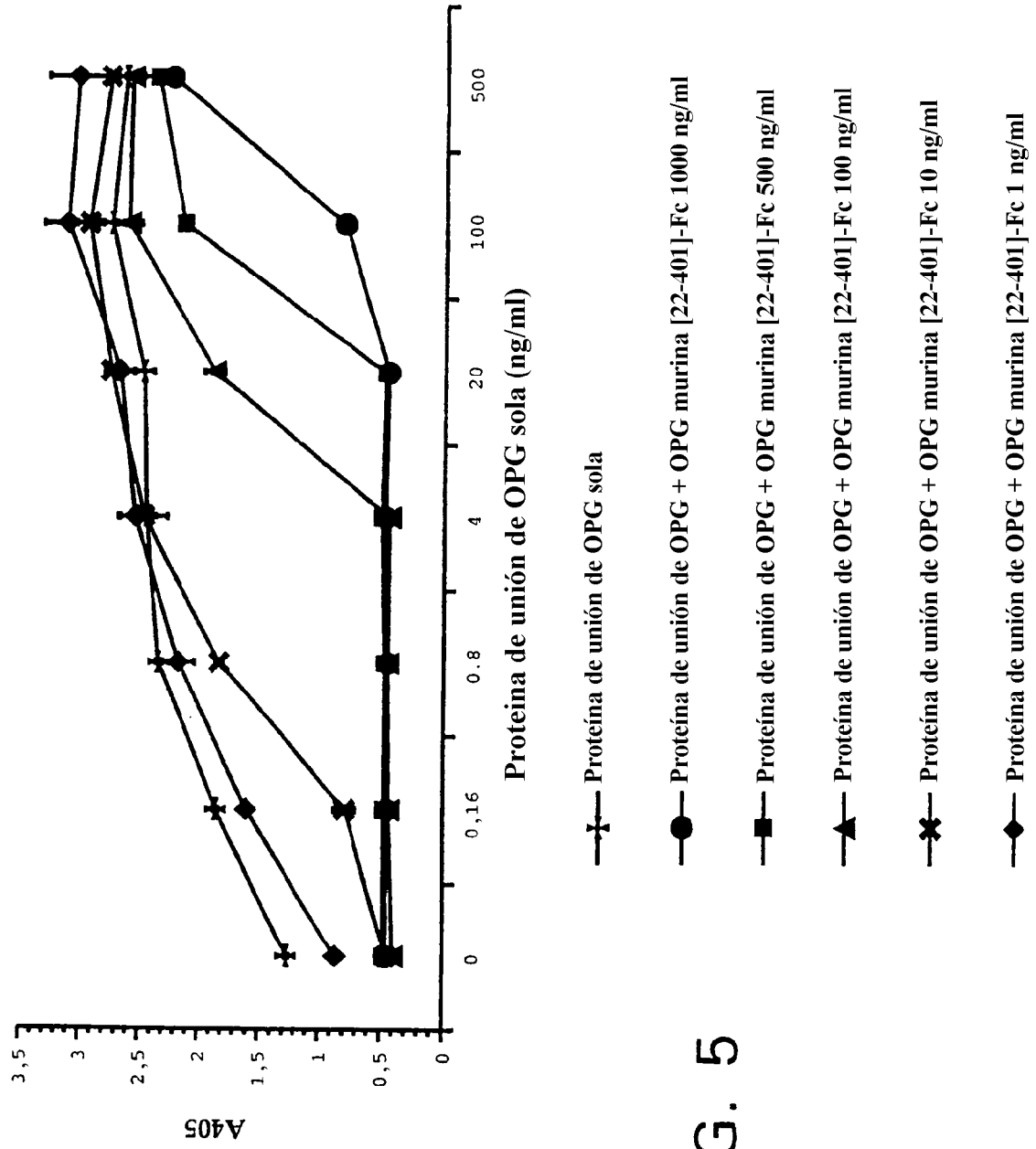


FIG. 5

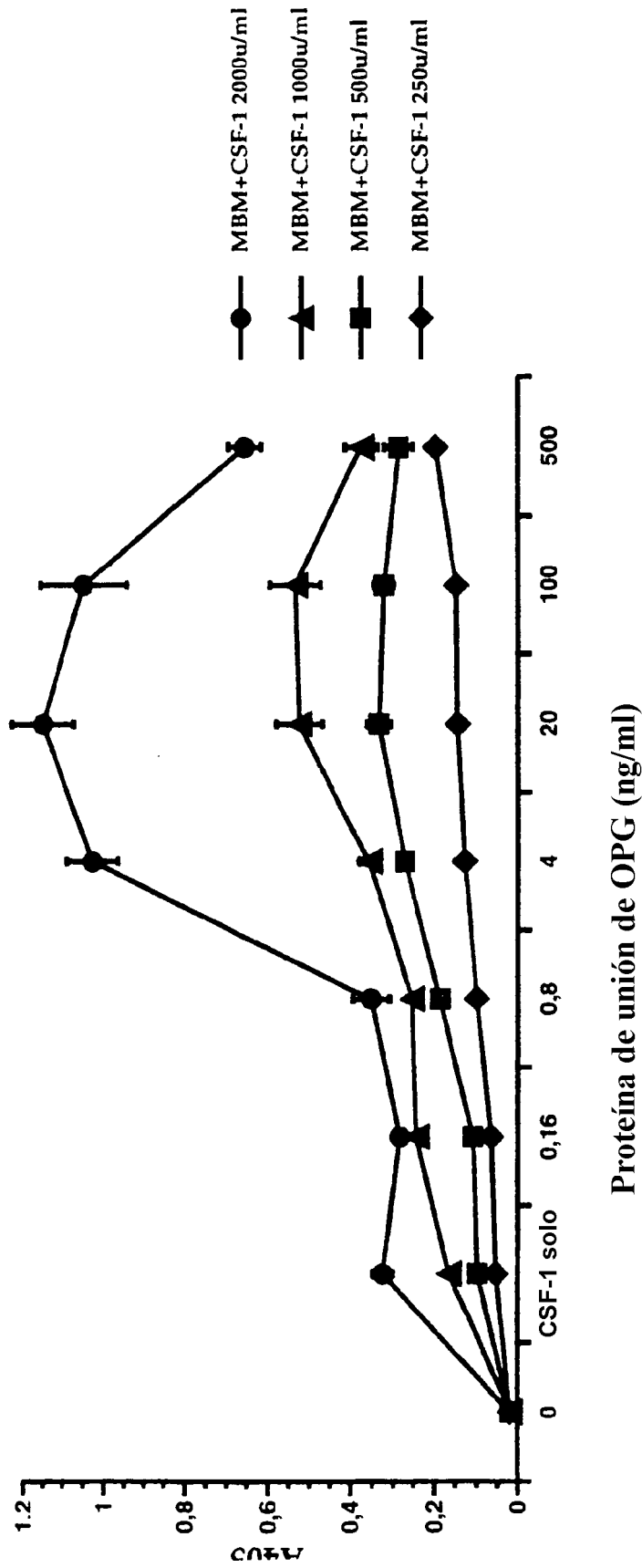
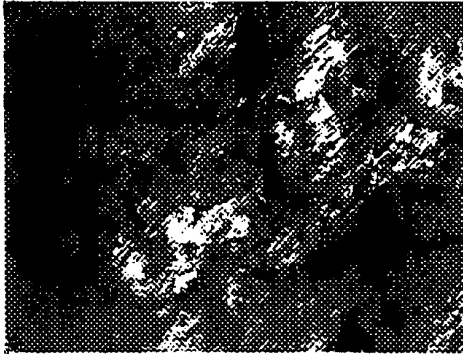


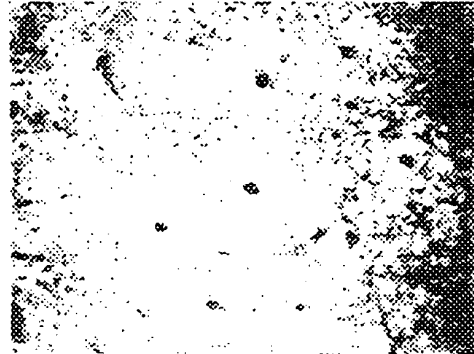
FIG. 6

FIG. 7A

Tinción azul de toluidina



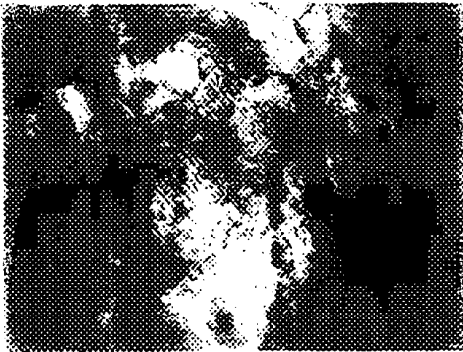
Tinción TRAP



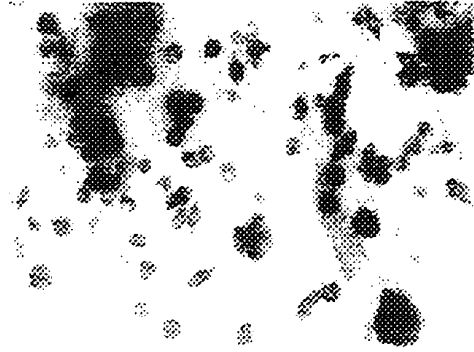
Células de la médula ósea + M-CSF-1

FIG. 7B

Tinción azul de toluidina



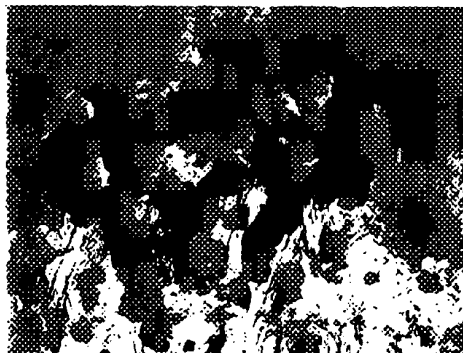
Tinción TRAP



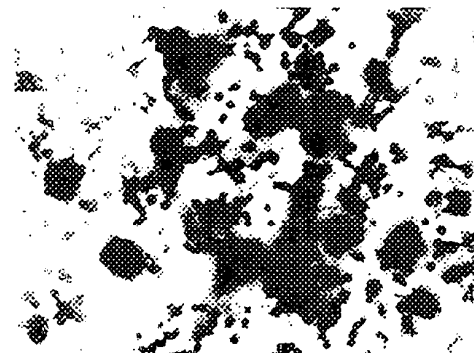
Células de la médula ósea + Proteína de unión OPG

FIG. 7C

Tinción azul de toluidina



Tinción TRAP



Células de la médula ósea + M-CSF-1 + Proteína de unión OPG

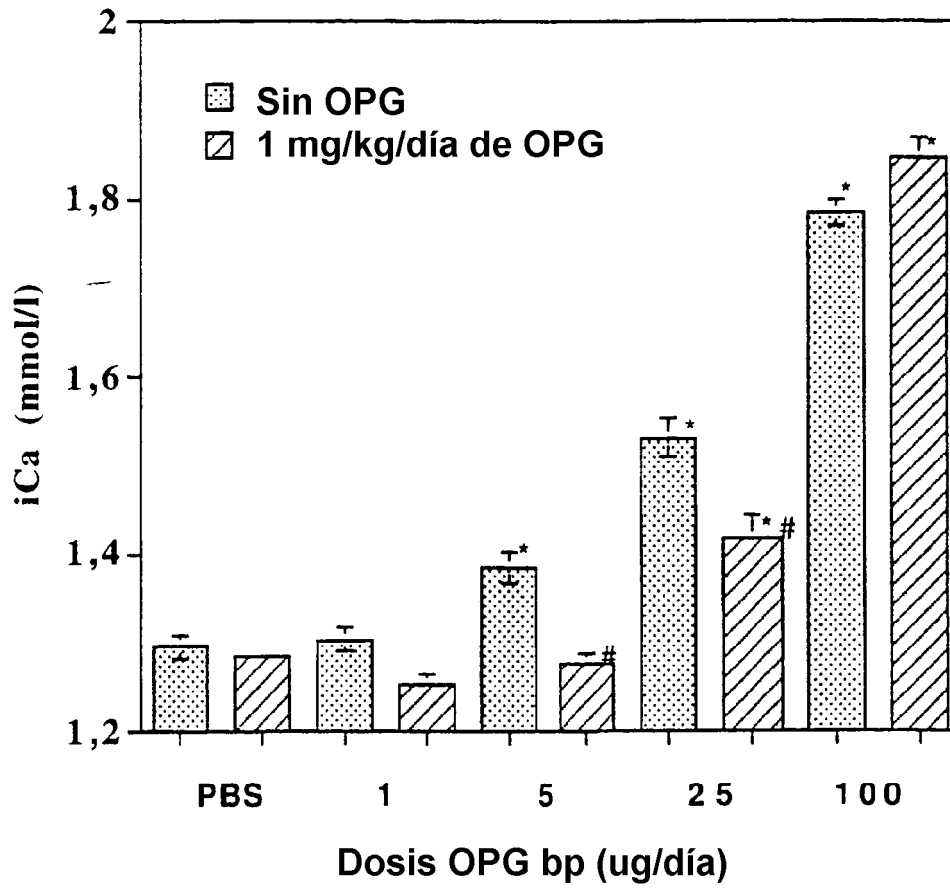


FIG. 8

PBS

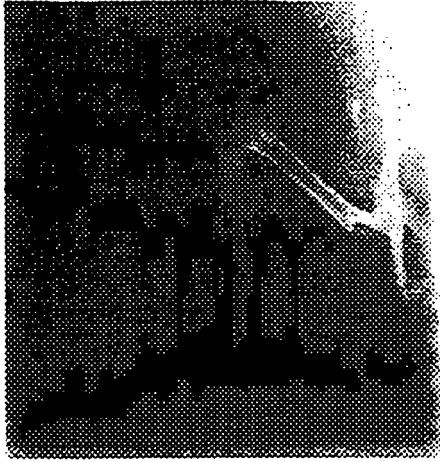


FIG. 9A

5 μ g/d OPG bp



FIG. 9B

25 μ g/d OPG bp



FIG. 9C

100 μ g/d OPG bp



FIG. 9D

```

10          30          50
ACTGACCACGGTCCGCCCGCCGCCATGGACCCGCGCGCCGGCCGCC
                                M D P R A R R R
70          90          110
GCCAGCTGCCCGCGCGTGGCGCTCTGGCGTCTGCTCGTTCCACTGCAGGTGACTC
Q L P A P L L A L C V L L V P L Q V T L
130        150        170
TCCAGGTCACTCTCCATGCACCCAGGAGGCATTATGAGCATCTCGGACGGTGTGCA
  Q V T P P C T Q E R H Y E H L G R C C S
190        210        230
GCAGATGCCGACCGAAAGTACCTGTCTCTAAGTGCACCTCCTACCTCCGACAGTGTT
  R C E P G K Y L S S K C T P T S D S V C
250        270        290
GTC TGCCCTGTGGCCCGATGAGTACTTGGACACCC TGGAA TGAAGAATAAATGCTTGC
  L P C G P D E Y L D T W N E E D K C L L
310        330        350
TGCATAAAGTCTGTGATGCAGGCAAGGCCCTGGTGGCGGTGGATCCTGGCAACCACCGG
  H K V C D A G K A L V A V D P G N H T A

```

FIG.10A

```
370                               390                               410
CCCCGGTCGCTGTGCTTGCACGGCTGGCTACCACTGGAACCTCAGACTGCCGAGTGCTGCC
P R R C A C T A G Y H W N S D C E C C R
430                               450                               470
GCAGGAACACGGAGTGTGCACCTGGCTTCGGAGCTCAGCATCCCTTGCAGCTCAACAAGG
R N T E C A P G F G A Q H P L Q L N K D
490                               510                               530
ATACGGTGTGCACACCCCTGCCCTCCCTGGGCTTCTTCAGATGTCCTTTTCGTCCACAGACA
T V C T P C L L G F F S D V F S S T D K
550                               570                               590
AATGCCAAACCTTGGACCAACTGCACCCCTCCCTTGGAAAGCTAGAAGCACACCCAGGGACAA
C K P W T N C T L L G K L E A H Q G T T
610                               630                               650
CGGAATCAGATGTGGTCTGCAGCTCTTCCATGACACTGAGGAGACCACCCCAAGGAGGCC
E S D V V C S S S M T L R R P P K E A Q
```

FIG.10B

```

670      690      710
AGGCTTACCTGCCAGTCTCATCGTTTCGTGCTCCTCCTTCATCTCTGTGGTAGTAGTGGCTG
  A Y L P S L I V L L L L F I S V V V V A A
730      750      770
CCATCATCTTCGGCGTTTACTACAGGAAGGGAGGAAAGCCGTGACAGCTAATTTGTGGA
  I I F G V Y Y R K G G K A L T A N L W N
790      810      830
ATTGGGTCAAATGATGCTTGCAGTAGTCTAAGTGGAAATAAGGAGTCCTCAGGGACCGTT
  W V N D A C S S L S G N K E S S G D R C
850      870      890
GTGCTGGTTCCCACTCGGCAACCTCCAGTCAGCAAGAAGTGTGAAGGTATCTTACTAA
  A G S H S A T S S Q Q E V C E G I L L M
910      930      950
TGACTCGGGAGGAGAAGATGGTTCAGAGACGGTCTGGAGTCTGTGGCCCTGTGTGTG
  T R E E K M V P E D G A G V C G P V C A
970      990     1010
CGGCAGGTGGGCCCTGGCAGAAGTCAGAGATTTCTAGGACGTTTCACACTGGTCAGCGAGG
  A G G P W A E V R D S R T F T L V S E V

```

FIG.10C

1030 1050 1070
 TTGAGACGCAAGGAGACCTCTCGAGGAAGATTCACAGAGGATGAGTACACGGACCGGC
 E T Q G D L S R K I P T E D E Y T D R P
 1090 1110 1130
 CCTCGACGCTTCGACTGGTTCACTGCTCCCTAATCCAGCAGGGAAGCAATCTATACCCC
 S Q P S T G S L L L I Q Q G S K S I P P
 1150 1170 1190
 CATTCCAGGAGCCCTGGAAGTGGGGGAGAACGACAGTTAAGCCAGTGTTCACCGGGA
 F Q E P L E V G E N D S L S Q C F T G T
 1210 1230 1250
 CTGAAGCACGGTGGATTCTGAGGGCTGTGACTTCACTGAGCCTCCGAGCAGAAGTACTGACT
 E S T V D S E G C D F T E P P S R T D S
 1270 1290 1310
 CTATGCCCGTGTCCCTGAAAAGCACCTGACAAAAGAAATAGAAAGGTGACAGTTGCCCTCC
 M P V S P E K H L T K E I E G D S C L P
 1330 1350 1370
 CCTGGGTGGTCCCAACTCAACAGATGGCTACACAGGCAGTGGGAACACTCCTGGGG
 W V V S S N S T D G Y T G S G N T P G E

FIG.10D

1390 1410 1430
 AGGACCATGAACCCCTTTCCAGGGTCCCTGAAATGTGGACCATTGCCCCAGTGTGCCCTACA
 D H E P F P G S L K C G P L P Q C A Y S
 1450 1470 1490
 GCATGGGCTTTCCAGTGAAGCAGCAGCCAGCATGGCAGAGGGGGAGTACGGCCCCCAGG
 M G F P S E A A A S M A E A G V R P Q D
 1510 1530 1550
 ACAGGGCTGATGAGAGGGAGCCCTCAGGGTCCGGAGCTCCCCAGTGACCCAGCCACCTG
 R A D E R G A S G S G S P S D Q P P A
 1570 1590 1610
 CCTCTGGGAACGTGACTGGAAACAGTAACTCCACGTTTCATCTCTAGCGGGCAGGTGATGA
 S G N V T G N S N S T F I S S G Q V M N
 1630 1650 1670
 ACTTCAAGGGTGACATCATCGTGGTGTATGTCAGCCAGACCCTCGCAGGAGGGCCCGGTT
 F K G D I I V V Y V S Q T S Q E G P G S
 1690 1710 1730
 CCGCAGAGCCCGAGTCGGAGCCCGTGGGCCCGCCCTGTGCAGGAGGAGACCGTGGCACACA
 A E P E S E P V G R P V Q E E T L A H R

FIG.10E

1750 1770 1790
 GAGACTCCTTTGGGGCACCGCGCGCTTCCCCGACGTCTGTGCCACCGGGCTGGGC
 D S F A G T A P R F P D V C A T G A G L
 1810 1830 1850
 TGCAGGACAGGGCACCCGGCAGAAGGACGGACATCGCGGCCGGTGCAGGAGCAGG
 Q E Q G A P R Q K D G T S R P V Q E Q G
 1870 1890 1910
 GTGGGGCCAGACTTCACTCCATACCCAGGGTCCGGACAATGTGCAGAAATGACCTCACC
 G A Q T S L H T Q G S G Q C A E
 1930 1950 1970
 TTCTCTGTCTGCCCTGGGTGCCAGGCCACCAGTGCCTTTCCAAAACATGGTGTAGCTAGC
 1990 2010 2030
 CACTGTGCACCTCCCTCACTGGTGCAGGCTGCTGGCATGGTGATGGAGCCCACCCTCTCACT
 2050 2070
 TCCTCCAGTGCCCCCTCTCCCTCTGCCTCCCTAC

FIG.10F

FIG. 11A



FIG. 11B

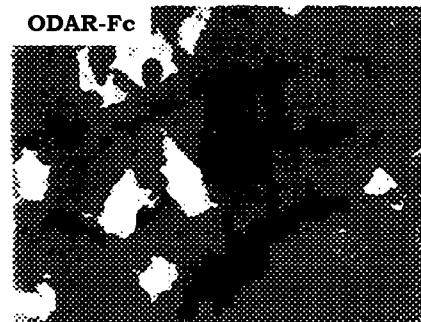
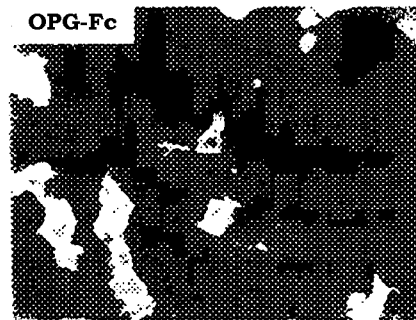


FIG. 11C



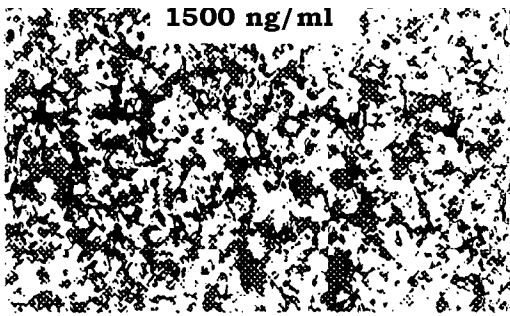


FIG. 12A

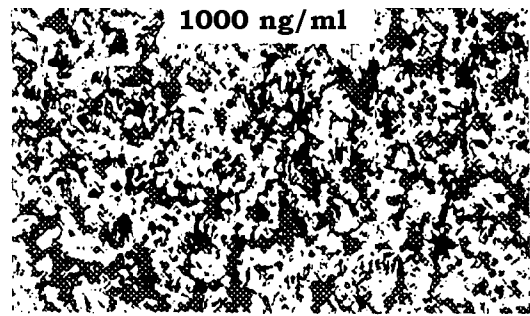


FIG. 12B

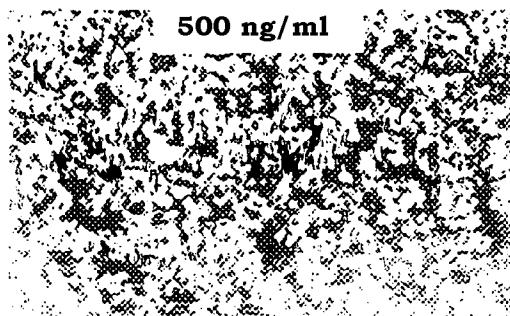


FIG. 12C

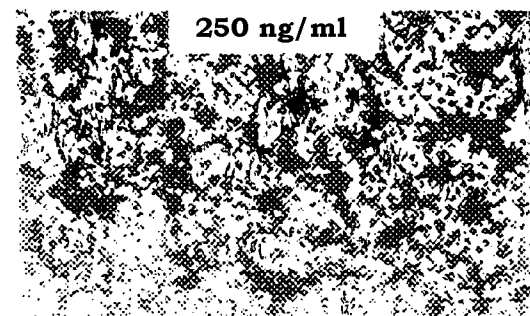


FIG. 12D

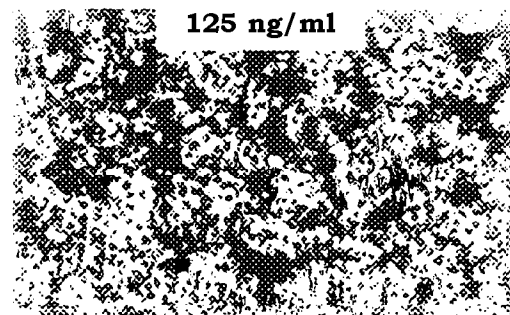


FIG. 12E

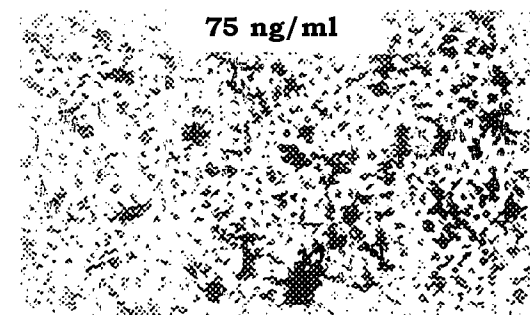


FIG. 12F

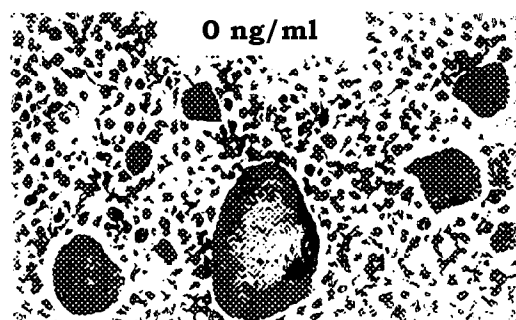
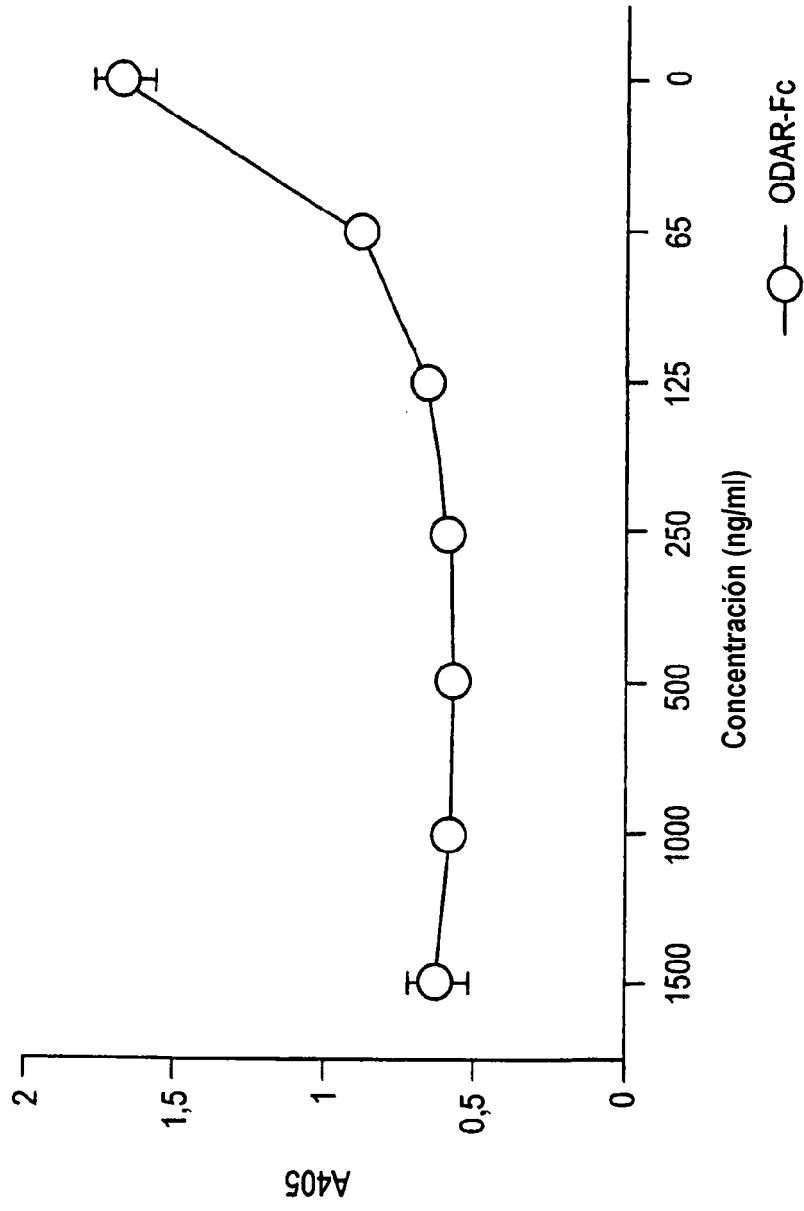
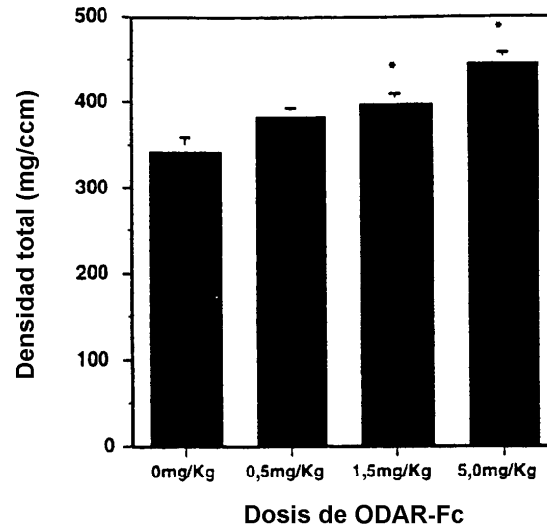


FIG. 12G

FIG. 12H





*Diferente respecto al control tratado con vehiculo $p < 0,05$

FIG.13